

BIANCA MEIRELLES MIRANDA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOGÊNICO E
PROTETOR DA PROTEÍNA LIGANTE DE HEPARINA
LPG 3 RECOMBINANTE DE *Leishmania infantum chagasi***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

Miranda, Bianca Meirelles, 1990-
M672a Avaliação do potencial imunogênico e protetor da proteína
2017 ligante de heparina LPG 3 recombinante de *Leishmania infantum*
chagasi / Bianca Meirelles Miranda. – Viçosa, MG, 2017.
xvii, 92f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Eduardo de Almeida Marques da Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Leishmaniose visceral. 2. *Leishmania infantum chagasi*.
3. Heparina. 4. Vacina. 5. Imunização. I. Universidade Federal
de Viçosa. Biologia Geral. Programa de Pós-graduação em
Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22 ed. 616.9364


BIANCA MEIRELLES MIRANDA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOGÊNICO E
PROTETOR DA PROTEÍNA LIGANTE DE HEPARINA
LPG 3 RECOMBINANTE DE *Leishmania infantum chagasi***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 06 de julho de 2017.


Michelle Dias de Oliveira Teixeira


Tiago Antônio de Oliveira Mendes


Eduardo de Almeida Marques da Silva
(Orientador)

“- Foi o tempo que perdeste com tua rosa que fez tua rosa tão importante.”

Antoine de Saint-Exupéry, O Pequeno Príncipe.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, que todos os dias de minha vida me deu forças para nunca desistir.

Aos meus amados pais Marco Antônio e Elenice, que acreditaram em mim e me acompanharam nesta trajetória, me incentivando sempre.

Aos meus queridos irmãos Felipe e Thaís pelo apoio.

À minha melhor amiga Bárbara, por se fazer sempre tão presente nos melhores e piores momentos.

Ao meu namorado Tallyson pelo suporte, amor e companheirismo.

Ao meu orientador Eduardo pelos ensinamentos, por estar sempre disponível e pela confiança. Sou muito grata por fazer parte do meu crescimento profissional!

Ao professor Leandro por toda contribuição para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos professores Juliana Fietto e Sérgio de Paula pelo consentimento da utilização dos seus laboratórios. Muito obrigada!

Aos professores da Pós-Graduação pelo conhecimento transmitido.

Aos professores que aceitaram o convite para participar da banca.

Aos meus companheiros de trabalho Adriana, Sabrina, Thaís, Lucas e Thatiane. Vocês foram essenciais! Muito obrigada por toda a ajuda!

Aos demais companheiros do laboratório pela convivência tão agradável.

À Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Geral e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade de concluir esse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e à FAPEMIG pelo apoio financeiro.

À secretária do programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, Beth.

Ao pessoal do Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos pelo acolhimento e pela troca de experiências.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise – NMM da UFV.

Às minhas queridas amigas de república pelo carinho e por deixarem meus dias mais leves e divertidos.

Aos demais amigos de Viçosa que fizeram desses últimos anos os melhores da minha vida!

Aos familiares e amigos de Tocantins que mesmo de longe se fizeram sempre presentes.

ÍNDICE

Lista de figuras.....	viii
Lista de siglas.....	x
Resumo.....	xiv
Abstract.....	xvi
1. Introdução.....	1
2. Revisão de literatura.....	3
2.1 <i>Leishmanioses: definição, agentes etiológicos e taxonomia.....</i>	<i>3</i>
2.2 <i>Transmissão e ciclo biológico de Leishmania sp.....</i>	<i>6</i>
2.3 <i>Manifestações clínicas da leishmaniose.....</i>	<i>10</i>
2.4 <i>Epidemiologia e urbanização da LV.....</i>	<i>15</i>
2.5 <i>Resposta imunológica na LV.....</i>	<i>17</i>
2.6 <i>Controle da LV.....</i>	<i>23</i>
2.7 <i>Lectinas e sua utilização como imunógeno.....</i>	<i>27</i>
3. Objetivos.....	31
3.1 <i>Objetivo geral.....</i>	<i>31</i>
3.2 <i>Objetivos específicos.....</i>	<i>31</i>
4. Delineamento experimental.....	32
5. Material e métodos.....	33
5.1 <i>Animal experimental.....</i>	<i>33</i>
5.2 <i>Obtenção dos parasitos.....</i>	<i>33</i>
5.3 <i>Cultura dos parasitos.....</i>	<i>34</i>
5.4 <i>Obtenção do antígeno particulado de L. infantum chagasi (AgLc).....</i>	<i>34</i>
5.5 <i>Obtenção da rPLHLc.....</i>	<i>34</i>

5.6 Experimentos de imunização e infecção.....	36
5.7 Métodos de eutanásia.....	36
5.8 Isolamento de células do baço/fígado para análise da carga parasitária dos camundongos infectados.....	37
5.9 Isolamento de células mononucleares do baço para dosagens de citocinas e de NO.....	37
5.10 Obtenção de soro para detecção dos isotipos IgG1/IgG2a.....	38
5.11 Dosagem de citocinas.....	39
5.12 Dosagem de NO.....	39
5.13 Dosagem de IgG1 e IgG2a.....	39
5.14 Análise estatística.....	40
6. Resultados.....	41
6.1 Quantificação da carga parasitária do baço e do fígado de camundongos BALB/c imunizados com rPLHLc.....	41
6.2 Avaliação da produção de citocinas produzidas por culturas de esplenócitos estimuladas com AgLc após imunização de camundongos BALB/c com rPLHLc e desafio com <i>L. infantum chagasi</i>	42
6.2.1 Produção de citocinas de perfil de resposta Th1.....	43
6.2.2 Produção de citocinas de perfil de resposta Th17.....	44
6.2.3 Produção de citocina reguladora IL-10.....	45
6.2.4 Produção de citocina de perfil Th2.....	46
6.3 Avaliação da produção de NO produzidas por cultura de esplenócitos estimulados com AgLc ou com rPLHLc após imunização de camundongos BALB/c com rPLHLc.....	47
6.4 Dosagem dos isotipos IgG1 e IgG2a anti-rPLHLc.....	49
6.4.1 IgG1.....	49
6.4.2 IgG2a.....	51
6.4.3 Razão IgG1/IgG2a.....	53
7. Discussão.....	56

8. Conclusões.....	65
9. Perspectivas de estudo.....	66
10. Referências bibliográficas.....	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Morfologia de <i>Leishmania</i> sp.....	4
Figura 2: Inseto vetor de <i>Leishmania</i> sp.....	7
Figura 3: Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> sp.....	10
Figura 4: Manifestações clínicas das leishmanioses.....	14
Figura 5: Quantificação da carga parasitária no baço.....	41
Figura 6: Quantificação da carga parasitária no fígado.....	42
Figura 7: Produção de IFN- γ , IL-2 e TNF.....	44
Figura 8: Produção de IL-17 e IL-6.....	45
Figura 9: Produção de IL-10.....	46
Figura 10: Produção de IL-4.....	47

Figura 11: Produção de NO por esplenócitos murinos após imunização com rPLHLc associada ou não com adjuvante e desafiados ou não com *L. infantum chagasi*.....48

Figura 12: Produção de IgG1 anti-rPLHLc em murinos após a imunização com AIF, SAP, rPLHLc, AIF + rPLHLc e SAP + rPLHLc.....50

Figura 13: Produção de IgG1 anti-rPLHLc em murinos após a imunização com AIF, SAP, rPLHLc, AIF + rPLHLc e SAP + rPLHLc e posterior desafio com *L. infantum chagasi*.....51

Figura 14: Produção de IgG2a anti-rPLHLc em murinos após a imunização com AIF, SAP, rPLHLc, AIF + rPLHLc e SAP + rPLHLc.....52

Figura 15: Produção de IgG2a anti-rPLHLc em murinos após a imunização com AIF, SAP, rPLHLc, AIF + rPLHLc e SAP + rPLHLc e posterior desafio com *L. infantum chagasi*.....53

Figura 16: Razão entre a produção de IgG1/IgG2a por camundongos imunizados com AIF, SAP, rPLHLc, AIF + rPLHLc e SAP + rPLHLc.....54

Figura 17: Razão entre a produção de IgG1/IgG2a por camundongos imunizados com AIF, SAP, rPLHLc, AIF + rPLHLc e SAP + rPLHLc e posteriormente desafiados com *L. infantum chagasi*.....55

LISTA DE SIGLAS

AgLc - Extrato particulado de *Leishmania infantum chagasi*

AIF - Adjuvante Incompleto de Freund

AP1 - Ativador de Proteína 1

ATP - Adenosina Trifosfato

Bcl-2 - Célula-B de Linfoma 2

CDs - Células dendríticas

CEUA - Comissão de Ética para Uso de Animais

CFMV - Conselho Federal de Medicina Veterinária

CR1 - Complemento receptor tipo 1

CR3 - Complemento receptor tipo 3

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

FML - Frações do Ligante de Manose-fucose

FPLC - *Fast Protein Liquid Chromatography*

GAGs - Glicosaminoglicanos

G-CSF - Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos

GIPL - Glico-inositol-fosfolípideo

Gp63 - Glicoproteína de Superfície de 63kDa

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

IFN- γ - Interferon Gama

IgG1 - Imunoglobulina G1

IgG2a - Imunoglobulina G2a

IL-10 - Interleucina 10

IL-12 - Interleucina 12

IL-17 - Interleucina-17

IL-17R - Receptor de Interleucina-17

IL-2 - Interleucina-2

IL-23 - Interleucina-23

IL-4 - Interleucina-4

IL-6 - Interleucina-6

iNOS - NO Sintetase Induzível

IPTG - Isopropyl β -D-thiogalactosideo

Jak-STAT - *Janus kinase-signal trasnducers and activators of transcription*

KCs - Células de Kupfer

kDNA - DNA Mitocondrial

KMP-11 - Proteína 11 da Membrana do Cinetoplasto

LB - Luria-Bertani

LC - Leishmaniose Cutânea

LCD - Leishmaniose Cutânea Difusa

LDPK - Leishmaniose Dérmica Pós-kalazar

LMC - Leishmaniose Mucocutânea

LPG - Lipofosfoglicano

LPG3 - Lipofosfoglicano 3

LT α - Linfotoxina Alfa

LV - Leishmaniose Visceral

LVC - Leishmaniose Visceral Canina

LVH - Leishmaniose Visceral Humana

MAC - Complexo de Ataque a Membrana

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade

NF- κ B - Fator Nuclear Kappa B

NK - Células *Natural Killer*

NO - Óxido nítrico

OMS - Organização Mundial da Saúde

OPD - Solução Reveladora Orto-fenil diamina

PAMPs - Padrões Moleculares Associados ao Patógeno

PBS - Salina Tamponada com Fosfato

PKC - Proteína Quinase C

PLHLc - Proteína Ligante de Heparina de *Leishmania infantum chagasi*

PLHs - Proteínas Ligantes de Heparina

PO - Proteína Ribossomal

PRRs - Receptores de Reconhecimento Padrão

PTK - Proteínas Tirosina Quinase

PTP - Proteína Citoplasmática Tirosina-fosfatase

rPLHLc - Proteína Recombinante Ligante de Heparina de *Leishmania infantum chagasi*

SAP - Adjuvante Saponina

SFB - Soro Fetal Bovino Inativado

SFM - Sistema Fagocítico Mononuclear

SLA - Antígeno Solúvel de *Leishmania*

SMT - Enzima Esterol Metiltransferase

TGF- β - Fator de Transformação do Crescimento-Beta

TLR2 - Receptor do Tipo Toll 2

TNF - Fator de Necrose Tumoral

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alfa

RESUMO

MIRANDA, Bianca Meirelles, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Avaliação do potencial imunogênico e protetor da proteína ligante de heparina LPG 3 recombinante de *Leishmania infantum chagasi*.** Orientador: Eduardo de Almeida Marques da Silva.

A Leishmaniose Visceral (LV) está amplamente distribuída em 98 países, com mais de 350 milhões de pessoas em risco. Não existem vacinas licenciadas para uso em humanos e o antimônio pentavalente ainda é o fármaco de primeira escolha para o tratamento da doença, apesar de sua toxicidade. Em um estudo prévio foram realizados ensaios sobre a participação de proteína ligante de heparina de *L. infantum chagasi* (PLHLc) no processo infeccioso do parasito, considerando os processos de adesão, penetração e internalização em macrófagos, demonstrando que a proteína nativa está envolvida na interação entre parasito e hospedeiro. Também foram demonstrados níveis de imunogenicidade e de proteção contra *L. infantum chagasi* quando camundongos BALB/c foram imunizados com a PLHLc nativa. A partir disso, foi feito o sequenciamento dessa proteína e a produção da sua forma recombinante (rPLHLc). Nesse trabalho, utilizamos a rPLHLc em experimentos de imunização de camundongos BALB/c para avaliar se, assim como a proteína nativa, a forma recombinante também confere imunogenicidade e proteção após desafio com as formas promastigotas do parasito. Nossos resultados mostraram que no teste de imunogenicidade, os grupos imunizados com a rPLHLc, com AIF + rPLHLc e com SAP + rPLHLc produziram níveis altos de IgG1 e IgG2a anti-rPLHLc quando comparados aos seus grupos controles, caracterizando, de acordo com a razão IgG1/IgG2a, resposta mista nos grupos imunizados com rPLHLc e SAP + rPLHLc e um perfil de resposta Th2 no grupo imunizado com AIF + rPLHLc. Já no teste de desafio, nossos resultados mostraram que houve redução da carga parasitária no baço e no fígado dos grupos imunizados com a rPLHLc, com AIF + rPLHLc e com SAP + rPLHLc. Os grupos imunizados com AIF + rPLHLc e com SAP + rPLHLc produziram as citocinas IFN- γ , TNF e IL-2, que direcionam o padrão de resposta imune para Th1, as citocinas IL-17 e IL-6 que direcionam para Th17 e a citocina reguladora IL-10, sendo que a média de produção dessas citocinas foi maior no grupo que tinha como adjuvante a SAP. Na produção de IgG1 e IgG2a anti-rPLHLc os grupos imunizados com a rPLHLc, com AIF + rPLHLc e com SAP + rPLHLc produziram níveis altos dos dois isotipos comparado aos seus

grupos controles e de acordo com a razão IgG1/IgG2a conclui-se que encontramos perfil de resposta Th1 nos grupos imunizados com rPLHLc e com SAP + rPLHLc e perfil de resposta Th2 no grupo imunizado com AIF + rPLHLc. Portanto, concluímos que houve imunogenicidade e proteção contra *L. infantum chagasi* quando os grupos experimentais são imunizados com a proteína recombinante, mostrando a viabilidade de uso da mesma como vacina e que o grupo imunizado com SAP + rPLHLc foi o que apresentou resultados mais promissores, o que torna essa preparação uma possível vacina contra LV.

ABSTRACT

MIRANDA, Bianca Meirelles, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2017. **Evaluation of the immunogenic and protective potential of the recombinant heparin binding protein LPG 3 from *Leishmania infantum chagasi*.** Advisor: Eduardo de Almeida Marques da Silva.

Visceral Leishmaniasis (VL) is widely distributed in 98 countries, with more than 350 million people at risk. There are no licensed vaccines for use in humans and the pentavalent antimony is still the drug of choice for treatment of this disease despite its toxicity. In a previous study, tests were performed on the involvement of the heparin binding protein of *L.infantum chagasi* (HBPLc) in the infectious process of the parasite, considering the processes of adhesion, penetration and internalization in macrophages, demonstrating that the native protein is involved in the interaction between parasite and host. Levels of immunogenicity and protection against *L. infantum chagasi* were also demonstrated when BALB/c mice were immunized with native HBPLc. From that, the sequencing of this protein and the production of its recombinant form (rHBPLc) was carried out. In this work, we used rHBPLc in experiments for immunization of BALB/c mice to evaluate whether, the recombinant protein form also confer immunogenicity and protection after challenge with the promastigote forms of the parasite. Our results showed that in the immunogenicity test, the groups immunized with rHBPLc, FIA + rHBPLc and ASP + rHBPLc produced high levels of anti-rHBPLc IgG1 and IgG2a when compared to their control groups, characterizing, according to the IgG1/IgG2a ratio, mixed response in the immunized groups with rHBPLc and ASP + rHBPLc and a Th2 response profile in the group immunized with FIA + rHBPLc. In the challenge test, our results showed that there was a reduction of the parasite load in the spleen and liver of the groups immunized with rHBPLc, with FIA + rHBPLc and with ASP + rHBPLc. The groups immunized with FIA + rHBPLc and ASP + rHBPLc produced the cytokines IFN- γ , TNF and IL-2, which direct the immune response pattern for Th1, the cytokines IL-17 and IL-6 directed for the Th17 and for the regulator cytokine IL-10, and the mean production of these cytokines was higher in the adjuvant group containing ASP. In the production of anti-rHBPLc IgG1 and IgG2a the groups immunized with rHBPLc, with FIA + rHBPLc and with ASP + rHBPLc produced high levels of the two isotypes compared to their control groups and according to the IgG1/IgG2a ratio we found that

Th1 response profile in the group immunized with rHBPLc and with ASP + rHBPLc and Th2 response profile in the group immunized with FIA + rHBPLc. Therefore, we concluded that there was immunogenicity and protection against *L.infantum chagasi* when the experimental groups were immunized with the recombinant protein, showing the feasibility of using it as a vaccine and that the group immunized with ASP + rHBPLc presented the most promising results, which makes this preparation a potential vaccine against VL.

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses fazem parte das doenças negligenciadas mais relacionadas com a pobreza em todo o mundo, afetando uma grande parte da população de países em desenvolvimento, e causando grandes taxas de mortalidade e morbidade. A leishmaniose visceral (LV) é a forma mais grave da doença que acomete órgãos vitais como fígado, baço e medula óssea e, se não tratada, pode levar o paciente a óbito. Embora exista muita informação sobre a biologia do parasito, ainda não existe um medicamento que seja altamente eficaz para o tratamento ou vacinas licenciadas para uso em humanos, o que seria uma importante forma de profilaxia contra essa doença (BELO *et al.* 2013; MUTISO *et al.*, 2013).

A procura por moléculas do parasito, presentes tanto na superfície de sua membrana quanto internamente, é de grande valia para a compreensão de mecanismos relacionados com sua virulência. Tais componentes podem ser utilizados como imunógenos em preparações vacinais que permitam a prevenção da infecção, visto que muitos deles podem participar dos processos de adesão, penetração ou mesmo da regulação de resposta imune, o que culmina na evasão das respostas imunes do hospedeiro (BELKAID *et al.*, 2000).

Dentre os candidatos a componentes desse processo, está um tipo de lectina, as proteínas ligantes de heparina, que se ligam especificamente em glicosaminoglicanos (GAGs), como sulfato de heparano e sulfato de dermatano presentes na superfície de macrófagos dos hospedeiros mamíferos (ALVES *et al.*, 2012).

Em nosso laboratório, foram feitos experimentos recentes que resultaram na purificação e caracterização de uma proteína ligante de heparina de formas promastigotas de *L. infantum chagasi* (PLHLc). Por ensaios de imunomarcção e de microscopia eletrônica de transmissão utilizando anticorpos anti-PLHLc foi mostrado que a distribuição dessa proteína é de forma homogênea pela superfície do parasito, em vacúolos citoplasmáticos e no citoplasma. Por experimento *in vitro* foi demonstrado que a PLHLc influencia no processo infeccioso do parasito, pois quando essa proteína foi

bloqueada através da interação com heparina, houve redução parcial da internalização de *Leishmania* em cultura de macrófagos (MARTINS *et al.*, 2015). Também foi demonstrado que a proteína nativa é imunogênica visto que o balanço da produção de citocinas e de NO induziram uma resposta mista Th1/Th2 em imunização de camundongos BALB/c, perfil este relatado na literatura como sendo de proteção contra a LV. Esses resultados foram confirmados, já que a PLHLc demonstrou eficácia protetora em experimentos de imunização contra infecção por *L. infantum chagasi* em camundongos BALB/c, uma vez que foi capaz de reduzir a carga parasitária no baço e no fígado dos animais experimentais e por ter induzido a produção de citocinas que direcionam para um perfil imune Th1/Th17, que também é encontrado na literatura como sendo eficaz na proteção contra a LV (dados não publicados).

Esses resultados nos conduziram para uma nova etapa de investigação, onde tivemos como objetivo avaliar a proteína recombinante quanto à imunogenicidade e proteção contra L. infantum chagasi em camundongos BALB/c. É importante ressaltar que a validação do uso da forma recombinante da proteína viabiliza a realização de testes posteriores, visto que há uma limitação muito grande para o uso da proteína nativa, que é obtida em quantidades muito pequenas a partir de grandes quantidades de parasito produzidos em meio de cultura. Mais experimentos em paralelo estão sendo realizados em nosso laboratório no que diz respeito à caracterização da estrutura da PLHLc e a perspectiva futura é obter cada vez mais resultados positivos que possam validar a utilização da nossa proteína para uso profilático contra LV, doença de grande importância na saúde pública.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Leishmanioses: definição, agentes etiológicos e taxonomia*

As leishmanioses são doenças tropicais negligenciadas cujos causadores são parasitos intracelulares obrigatórios pertencentes ao reino Protista, classe Kinetoplastida, ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*, que compreendem organismos unicelulares caracterizados pela presença de um único flagelo e de uma organela rica em DNA mitocondrial (kDNA), o cinetoplasto. Os parasitos que pertencem ao gênero *Leishmania* são digenéticos e apresentam duas formas evolutivas durante o seu ciclo de vida, e essas formas evolutivas diferenciam tanto em relação à sua morfologia quanto à sua motilidade: (a) forma amastigota – é um estágio intracelular do protozoário, que pode ser encontrada parasitando as células do sistema fagocitário dos hospedeiros vertebrados. É uma célula ovoide, imóvel, possui flagelo interno e mede, em média, entre 3 e 5 μm , o que varia de acordo com o complexo a que pertencem (Figura 1-A). Essa forma do parasito é a responsável pela disseminação e manutenção da patologia no hospedeiro mamífero e é responsável pela infecção dos agentes vetores e (b) forma promastigota – é um estágio extracelular do protozoário, que se desenvolve no tubo digestivo dos hospedeiros invertebrados e também pode ser encontrada em culturas axênicas, onde pode ser mantida em laboratório. É uma célula alongada, possui flagelo livre, com grande mobilidade e mede em torno de 14 a 20 μm (Figura 1-B). As formas promastigotas são inoculadas em mamíferos durante o repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos, que atuam como hospedeiros invertebrados desses parasitos (NETO *et al.*, 2013; KEDZIERSKI, 2011; DOSTALOVA *et al.*, 2012).

As diferentes espécies do gênero *Leishmania* produzem uma variedade de manifestações clínicas que dependem da interação entre a resposta imune do hospedeiro vertebrado e da invasividade, tropismo e patogenicidade deste parasito. Porém, existe uma grande dificuldade na classificação das espécies do gênero *Leishmania*, devido à enorme semelhança morfológica entre elas (WILSON *et al.*, 1990; CHANCE, 1979).

Inicialmente, o gênero *Leishmania* tinha suas espécies identificadas em função do aspecto clínico das doenças, muito embora os dados epidemiológicos envolvendo uma

grande variedade de vetores e reservatórios sugerisse que este gênero seria certamente composto de populações de parasitos bastante heterogêneos. Um marco para a classificação de *Leishmania* foi apresentada em 1987 e até hoje é dada como razoável o uso dessa classificação. As diferenças morfológicas entre as espécies de parasitos foram demonstradas usando técnicas de impressão, fixação, coloração e microfotografia. Esses protozoários em complexos foram agrupados em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*. Esses subgêneros agrupam os parasitos de acordo com as suas características biológicas, tamanho, local de colonização no intestino do inseto vetor, distribuição geográfica e características diferenciais como sorotipagem e perfil enzimático (PESSOA, 1961; LAINSON; SHAW, 1987).

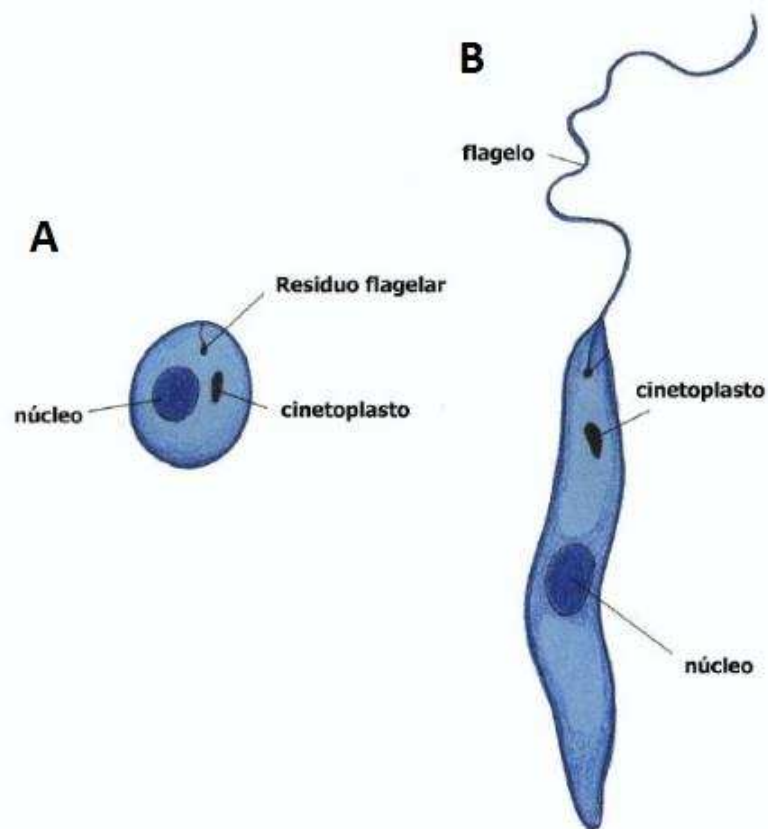


Figura 1: Morfologia de *Leishmania* sp. Figura esquemática mostrando a forma amastigota (A) e a forma promastigota (B). Figura adaptada, disponível em <<https://es.slideshare.net/tecnomexico/proto>>.

O subgênero *Viannia* inclui os parasitos que pertencem ao complexo “*Leishmania braziliensis*” e agrupam espécies como *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) panamensis*, *Leishmania (Viannia) peruviana* e *Leishmania (Viannia) guyanensis*. O ciclo de vida do inseto vetor inclui uma fase de desenvolvimento

prolífica em que apresentava formas paramastigotas arredondadas e ovoides, bem como algumas formas promastigotas aderidas à parede do intestino posterior por meio de hemidesmossomos flagelares. Porém, ocorre uma migração dos parasitos para os intestinos médio e anterior. As formas amastigotas pertencentes a este subgênero não apresentam tropismo visceral, sendo responsáveis pelas formas tegumentares da doença (LAINSON; SHAW, 1987).

O subgênero *Leishmania* é classificado em dois complexos denominados “*Leishmania mexicana*” e “*Leishmania donovani*”. Os protozoários de ambos os complexos têm o ciclo de vida no inseto vetor limitado aos intestinos médio e anterior, mas se diferenciam em relação ao tamanho da forma intracelular do parasito e em relação às lesões provocadas em seus hospedeiros vertebrados. Os parasitos que pertencem ao complexo *Leishmania mexicana* apresentam formas amastigotas pequenas, e as lesões causadas no homem por esses protozoários se restringem à pele, sendo consideradas benignas. Pertencem a esse complexo as seguintes espécies: *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Leishmania) amazonenses*, *Leishmania (Leishmania) venezuelensis* e *Leishmania (Leishmania) pifanoi*. No complexo *Leishmania donovani* estão presentes as espécies responsáveis pela LV, forma mais grave da doença, uma vez que possuem um forte tropismo a invadir e disseminar os órgãos viscerais. Pertencem a esse complexo as seguintes espécies: *Leishmania (Leishmania) donovani*, *Leishmania (Leishmania) infantum* e *Leishmania (Leishmania) chagasi*. As duas primeiras espécies são responsáveis pela LV no Velho Mundo e a última é responsável por essa forma clínica no Novo Mundo (LAINSON; SHAW, 1988; CUPOLILLO *et al.*, 1994).

Existe, há alguns anos, um dilema taxonômico em relação ao nome usado para se referir ao parasito causador da LV humana e canina nas Américas. Há várias hipóteses relacionadas com a origem de *L. chagasi*. Muitos autores acreditam, baseados na semelhança entre os perfis enzimáticos e por técnicas de biologia molecular, que *L. chagasi* é somente um sinônimo de *L. infantum*, trazida para as Américas pelos cães dos colonizadores europeus, e que nesse caso, a importação deveria ter ocorrido por um longo período, permitindo assim uma seleção de populações do parasito e sua sobrevivência no novo hospedeiro invertebrado. Outros sugerem que a leishmaniose visceral da América pode ser causada por ambos parasitos *L. chagasi* e *L. infantum*. Outros ainda propõem que mesmo com as grandes semelhanças observadas entre os

agentes causadores de LV no Velho e Novo Mundo, *L. chagasi* já existia muito antes da colonização, uma vez que foram observadas diferenças nos perfis de restrição de kDNA e nas proteínas de superfície de suas promastigotas (LAINSON & RANGEL, 2005).

Quanto á nomenclatura, alguns autores têm usado *L. (L.) infantum infantum* e *L. (L.) infantum chagasi*, sugerindo que a separação taxonômica dos parasitos poderia ser ao nível subespecífico. Por outro lado, é mais usual a nomenclatura utilizada por outros autores, *L. chagasi* e *L. infantum* como espécies sinônimas, sem que haja mudança no nome ao nível de subespécie, pois isso implicaria em toda uma reclassificação do gênero *Leishmania*. Contudo, de acordo com o código da Comissão Internacional de Nomenclatura Zoológica, os nomes *L. (L.) infantum infantum* e *L. (L.) infantum chagasi* seriam absolutamente corretos (KILLICK-KENDRICK, 1985; GRIMALDI JR. *et al.*, 1987; RIOUX *et al.*, 1990; MAURÍCIO *et al.*, 2000).

Apesar dos inúmeros estudos, das especulações e discussões, ainda não se tem definido uma taxonomia oficial para esse caso, então o nosso grupo de pesquisa opta por fazer uso da nomenclatura *Leishmania infantum chagasi* para nos referir ao agente infeccioso da LV nas Américas. De um modo geral, atualmente são conhecidas 53 espécies de *Leishmania* no quadro atualizado das espécies de *Leishmania* (sem considerar os sinônimos e incluindo todos os cinco subgêneros e complexos: *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania*, complexo *L. Enriettii* e *Paraleishmania*), e pelo menos 21 delas são patógenas para os seres humanos (AKHOUNDI *et al.*, 2016a, 2016b).

2.2 Transmissão e ciclo biológico de *Leishmania sp*

A transmissão da *Leishmania sp* ao hospedeiro vertebrado ocorre pela picada de fêmeas hematófagas de insetos flebotomíneos da subfamília *Phlebotominae* (GALATI, 2003), pertencentes ao gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo (KILLICK-KENDRICK, 1990) e aos gêneros *Lutzomyia*, *Psychodopygus*, *Pintomyia*, *Nyssomyia*, dentre outros, no Novo Mundo (BRAZIL *et al.*, 2015). A principal espécie vetor da *L. infantum chagasi* é a *Lutzomyia longipalpis*, mas a transmissão também pode ocorrer por *Lutzomyia cruzi* e *Lutzomyia evansi* (BELO *et al.*, 2013; VIANNA *et al.*, 2016).

Estes insetos medem cerca de 1,5 a 3 mm de comprimento, têm o corpo revestido de pelos, possuem coloração castanho claro ou cor de palha e apresentam um par de asas e um par de pequenas estruturas, chamados de halteres ou balancins, responsáveis pela estabilidade do voo e o zumbido característico dos dípteros (Figura 2) (MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASÍLIA, 2006).



Figura 2: Inseto vetor de *Leishmania* sp. Adaptada de STEBUT E. V. Leishmaniasis. *Journal of the German Society of Dermatology (JDDG)*, 1610-0379, 1303, 2015. DOI: 10.1111/ddg.12595.

No Brasil, dependendo da região geográfica, os flebotomíneos são popularmente chamados de: “mosquito palha”, “birigui”, “flebótomo”, “asa dura”, “asa branca”, “cangalhinha” ou “provarinho”. Acredita-se que a maioria destes nomes populares dados aos flebotomíneos tem relação com as suas características físicas ou comportamentais (por exemplo: mosquito palha = cor do inseto; cangalhinha = posição do tórax semelhante a uma “cangalha”; asa dura e asa branca = características das asas; “provarinho” = ato de “provar” a pele antes de picar os hospedeiros, etc...) (SILVA-NETO *et al.*, 2013).

A primeira descrição científica de um flebotomíneo foi feita por Philippo Bonanni em 1691, em Roma (BEAUTY; MARQUARDT, 1996). Entretanto, a evidência experimental da transmissão de protozoários do gênero *Leishmania* pela picada de uma fêmea só ocorreu por Shortt e colaboradores em 1931. Desde então, os flebotomíneos

são considerados os únicos insetos comprovadamente capazes de transmitir a doença (SILVA-NETO *et al.*, 2013). É possível atualmente encontrar na literatura informações sobre o possível papel de outros artrópodes na transmissão de leishmanioses, como por exemplo, carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus*, pois foi demonstrado uma capacidade de infecção de 15,4% e os macerados dos mesmos reproduziram a doença em camundongos. No entanto, ainda não foi comprovada a participação na transmissão natural da leishmaniose (COUTINHO *et al.*, 2005). Outros casos registrados menos frequentes de transmissão de leishmaniose são por transmissão congênita, por transfusão de sangue e por agulhas contaminadas compartilhadas por usuários de drogas (BELO *et al.*, 2013).

A maioria das espécies de flebotomíneos está presente nas regiões tropicais e subtropicais, sendo poucas encontradas em regiões temperadas. Os insetos ocupam uma variedade de nichos ambientais, tais como silvestres, desérticos e florestais (SILVA-NETO *et al.*, 2013). As preferências sobre o “habitat” influenciam o grau de contato que eles exercem sobre os humanos (DAVIES *et al.*, 2000). É muito provável que a expansão da doença para locais onde ainda não eram atingidos esteja relacionado com o aquecimento global, ou então que este efeito climático possibilite uma mudança no período dos estágios de desenvolvimento do inseto. Estas sugestões são fundamentadas quando relacionadas com catástrofes naturais, como os terremotos, que modificam a paisagem e resultam no aparecimento de novos focos de leishmaniose, atingindo conseqüentemente algumas áreas em que antes a doença não era observada (MONTALVO *et al.*, 2012).

O mecanismo de transmissão da leishmaniose envolve complexas interações entre o parasito, os vetores, os hospedeiros vertebrados e os diferentes ecótopos (DANTAS-TORRES *et al.*, 2012). Os hospedeiros vertebrados mais comuns são os roedores, os primatas, incluindo seres humanos, e os caninos, que são os principais reservatórios domésticos de *L. infantum chagasi*, resultando na Leishmaniose Visceral Canina (LVC) (WHO, 2010; WHO, 2015; DANTAS-TORRES, 2009).

O ciclo de vida da *Leishmania* sp envolve dois estágios. A leishmaniose é uma enfermidade metaxênica porque um dos estágios acontece por transformações do parasito no hospedeiro invertebrado. Já o outro estágio acontece por transformações do parasito no hospedeiro mamífero (Figura 3). As fêmeas de flebotomíneos, ao realizarem

repasto sanguíneo em hospedeiros vertebrados infectados, adquirem o protozoário, pois durante a hematogafia, juntamente com o sangue os insetos ingerem macrófagos infectados por formas amastigotas do patógeno que são liberadas no seu intestino após a ruptura desses fagócitos, dando início ao ciclo de vida do parasito no inseto vetor. A partir daí as formas amastigotas se transformam em promastigotas procíclicas, e essa mudança é influenciada por alterações nas condições do ambiente encontrado no interior do intestino do inseto em relação às do hospedeiro vertebrado, como o aumento do pH e diminuição da temperatura. As formas procíclicas se multiplicam rapidamente e se diferenciam em metacíclicas, que são as formas responsáveis pela infecciosidade do parasito. Esse processo é conhecido como metaciclo-gênese. E as formas promastigotas metacíclicas migram para a faringedeo inseto vetor e quando este realiza a hematofagia novamente, acaba inoculando essas formas do parasito em um próximo hospedeiro vertebrado (DANTAS-TORRES, 2006; ESCH; PETERSEN, 2013). Ao serem inoculadas, as formas promastigotas metacíclicas invadem os vasos superficiais da derme do hospedeiro mamífero e são fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) e por neutrófilos que são recrutados para o sítio de infecção. No interior dos macrófagos as formas promastigotas metacíclicas se transformam em formas amastigotas, que é a única forma encontrada em lesões de seres humanos e de outros vertebrados, e se multiplicam até causarem a lise dessas células. Essas amastigotas podem então ser fagocitadas por novos macrófagos ou podem ser ingeridas por outro inseto vetor durante o repasto sanguíneo, mantendo, assim, o ciclo da doença (DOSTALOVA; VOLF, 2012; RIBEIRO-GOMES; SACKS, 2012).

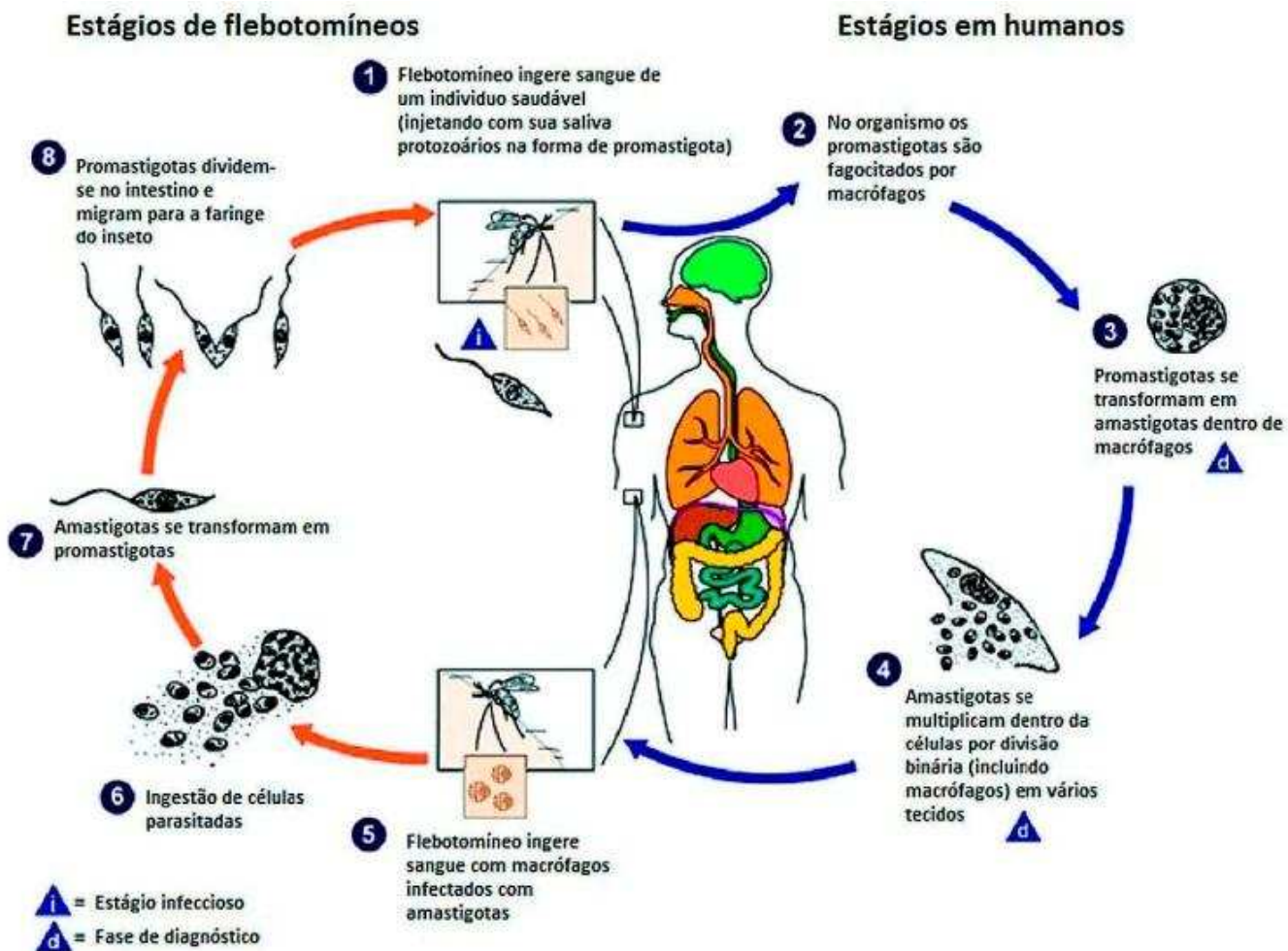


Figura 3: Ciclo de vida de *Leishmania sp.* Modificado de <<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/images/ParasiteImages/GL/Leishmaniasis/LeishmaniaLifeCycle.gif>>.

2.3 Manifestações clínicas da leishmaniose

As manifestações clínicas da leishmaniose ocorrem em um espectro completo que varia de assintomático a letal. Isto depende da espécie infecciosa, do vetor, do estado imunológico, idade e estado nutricional do hospedeiro, do local e da dose de inoculação e do histórico genético do hospedeiro (AKILOV *et al.*, 2007; SCHWARTZ *et al.*, 2006; BOGDAN *et al.*, 2012). As síndromes variam de pequenas lesões cutâneas a acometimento de órgãos internos viscerais (WHO, 2010). Conseqüentemente, existem pelo menos três formas clínicas principais da doença: a leishmaniose cutânea (LC), a leishmaniose mucocutânea (LMC) e a leishmaniose visceral (LV). Existem também outras formas que incluem a leishmaniose cutânea difusa (LCD) e a leishmaniose dérmica pós-kalazar (LDPK), e estas são muitas vezes ligadas ao estado imunológico do hospedeiro (SINGH *et al.*, 2005).

A LC é a forma mais comum de leishmaniose e, independentemente das espécies que causam a infecção, as lesões cutâneas começam como pápulas isoladas em partes expostas do corpo e bem circunscritas no local de inoculação. Estas pápulas podem então aumentar para formar nódulos e placas que às vezes têm escala associada, mas muitas vezes se tornam ulceradas. As úlceras são tipicamente indolores, que se desenvolvem semanas a meses após a picada e muitas vezes têm bordas endurecidas com erosão central, que pode ser coberta por uma crosta. Estas podem tornar-se dolorosas se sobrepuerem uma articulação ou se forem infectadas secundariamente por bactérias ou fungos. As úlceras frequentemente cicatrizam espontaneamente durante um período de meses e podem deixar cicatrizes atróficas cribriformes com halo hiper pigmentado (Figura 4-A) (WHO, 2016; MELBY *et al.*, 1992; WEITZEL *et al.*, 2005; AKILOV *et al.*, 2007; SCHWARTZ *et al.*, 2008). Os parasitos podem persistir em cicatrizes e nos linfonodos apesar do tratamento, possivelmente resultando na reativação da LC durante um período de imunossupressão (BOGDAN *et al.*, 2012). Diversas espécies de *Leishmania* são responsáveis pela LC. No Velho Mundo são as *L. tropica* e *L. major* e no Novo Mundo são as *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. panamensis*, *L. peruviana* e *L. guyanensis* nas Américas do Sul e Central (WHO, 2010; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

A LCD, também conhecida como leishmaniose anérgica ou lepromatosa faz parte dos fenótipos da LC. Esta forma é caracterizada por pápulas ou nódulos de tamanhos variados que surgem nas regiões da face, orelhas, cotovelos, joelhos e podem, eventualmente, se alastrar pela superfície corporal (Figura 4-B). Devido à sua propensão para numerosas lesões faciais, é muitas vezes comparada a fácies leonina de lepra lepromatosa. A ocorrência de ulceração não é característica dessa forma e geralmente não há cura espontânea das lesões. Essa patologia tem sido associada apenas às espécies *L. amazonensis* e *L. mexicana* (LUPI *et al.*, 2009, WHO, 2010; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; HANDLER *et al.*, 2015).

A LMC é frequentemente considerada como LC "metastática", porque é decorrente da metástase do parasito via linfática ou via hematogênica para os tecidos da mucosa oral e do trato respiratório superior. Desenvolve como uma seqüela incomum da doença cutânea, 1 a 2 anos ou mais após a cura clínica de lesões cutâneas primárias. As manifestações clínicas iniciais incluem congestão nasal persistente e sangramento, e sintomas faríngeos, tais como rouquidão, e visualmente revela eritemas e edemas. A

mucosa dos olhos ou órgãos genitais raramente está envolvida (LUPI *et al.*, 2009; SCHWARTZ *et al.*, 2006). Nos casos mais graves, a LMC leva à destruição mutilante das membranas mucosas do nariz, boca, garganta e tecidos circundantes. As lesões nasais são as mais frequentes, com a formação de nódulos e infiltração no septo cartilaginoso superior, levando à obstrução da narina (Figura 4-C) (WHO,2016). Essa forma da doença causa, além de problemas físicos, enormes consequências psíquicas, uma vez que as pessoas acometidas são vítimas de preconceito e até mesmo isolamento devido ao aspecto desfigurante decorrente da doença (GIUDICE *et al.*, 2012). A LMC é causada pelas espécies *L. braziliensis* e *L.panamensis* e a maioria dos casos são relatados no Brasil, Bolívia e Peru (WHO, 2010; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

A LV é a forma mais grave dentre as formas clínicas das leishmanioses e na maioria dos casos, se não for tratada em menos de 2 anos, se torna fatal (WHO, 2016; WHO, 2014). É também conhecida como Kala-azar, uma palavra de origem Hindi, que significa doença fatal ou doença negra (Kal significa fatal, Kala significa negra, e azar significa doença) (ZIJLSTRA; EL-HASSAN, 2001). É causada por parasitos que pertencem ao complexo *L. donovani*, que incluem *L. donovani* e *L. infantum chagasi*. Casos menos comuns causados por *L. tropica* foram reportados no Oriente Médio (WHO, 2010). Mais de 90% dos casos estão concentrados em seis principais países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão e Sudão do Sul (LEISHMAN, 1994). Este tipo de leishmaniose desenvolve-se meses a anos após a inoculação e é resultado de macrófagos infectados que se disseminam pelo sistema reticuloendotelial. Esses protozoários possuem um forte tropismo para invadir as vísceras, onde se localizam de preferência no baço e fígado, além da medula óssea e órgãos linfoides (COTA *et al.*, 2013). As manifestações clínicas da LV caracterizam-se por episódios irregulares de febre, perda de peso significativa, anorexia, fraqueza, palidez, tosse, diarreia, epistaxe, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia e retardo do crescimento em crianças (FIGURA 4-D). Em certas populações de pacientes, pode-se notar hiperpigmentação significativa que explica o nome de "doença negra". As anomalias laboratoriais incluem anemia normocítica, trombocitopenia, neutropenia, transaminite, hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia. Muitas infecções são assintomáticas. No entanto, as condições nutricionais e imunológicas do hospedeiro podem contribuir com a progressão e gravidade da patologia. A morte geralmente resulta de infecção, seguida de anemia grave ou hemorragia (KEVRIC *et al.*, 2015; MALTEZOU *et al.*, 2000).

Outro fator preocupante em relação à LV é a co-infecção com HIV pré-existente ser comum, complicando ainda mais o quadro clínico e o tratamento dos pacientes (WEITZEL *et al.*, 2005; ALVAR *et al.*, 2008). Diante de um quadro de LV é observado um aumento na taxa de replicação do vírus HIV. O efeito sinérgico negativo de ambas as infecções sobre a resposta celular do indivíduo ocorre devido a similaridades entre as células imunes alvos, resultando em uma crônica estimulação do sistema imunológico (PRESS, 2016). Com isso, os indivíduos imunocomprometidos têm manifestações atípicas e mais graves, uma vez que a ativação das células T é importante na imunorregulação da leishmaniose, os pacientes infectados pelo HIV e aqueles com supressão iatrogênica de células T causada por corticosteroides, quimioterapia, anticitoquinas e transplante são os mais vulneráveis (ALVAR *et al.*, 2008; XYNOS *et al.*, 2009; ANTINORI *et al.*; 2008).

Uma doença cutânea pode se manifestar em pacientes que receberam tratamento para LV e que permaneceram assintomáticos por meses e anos: a chamada Leishmaniose Dérmica Pós-Kalazar (LDPK). Considerada como uma fonte ativa de infecção kala-azar, suas manifestações clínicas caracterizam-se como máculas hipopigmentadas difusas, erupções malares, pápulas, nódulos e placas em todas as partes do corpo. A patogênese da LDPK, que ainda é pouco compreendida, parece estar relacionada a uma grande produção de interferon-gama (IFN- γ) pelo sistema imunológico do hospedeiro em resposta aos parasitos dérmicos remanescentes. Em biópsias de lesões são encontrados macrófagos infectados por amastigotas com o mesmo genótipo do parasito que levou à LV (KEVRIC *et al.*, 2015). Esse tipo de leishmaniose é quase exclusivamente encontrado na África Oriental e na Índia, onde a *L. donovani* é o agente etiológico (WHO, 2014; AKILOV *et al.*, 2007; BERMAN *et al.*, 1997).

Uma questão que vem sendo bastante questionada é a explicação das diferenças de localização das espécies que causam as diferentes formas clínicas das leishmanioses, ou seja, como algumas espécies migram e proliferam nos órgãos viscerais, como *L. donovani*, e outras, como *L. major*, se restringem à pele (MCCALL *et al.*, 2013a).

Leishmania apresenta fatores de virulência que compreendem um conjunto de recursos que potencializam sua capacidade em causar doença no hospedeiro. Podem afetar a invasão da célula hospedeira, a modulação da resposta imune, a tolerância ao

estresse oxidativo e ao estresse de temperatura. Então, um fator que podemos apontar como causa das manifestações clínicas causadas pelas diferentes espécies de *Leishmania* é a existência de diferentes fatores de virulência entre as espécies do parasito. Um exemplo é a correlação da virulência com a tolerância ao estresse de temperatura. As *Leishmania* cutanotrópicas são menos resistentes a altas temperaturas do que as *Leishmania* viscerotrópicas, característica esta que se apresenta em consonância com as temperaturas limites de seus órgãos alvos (BIFELD; CLOS, 2015).

O vetor também pode influenciar as diferenças no comportamento das espécies cutâneas e viscerais. A saliva dos flebotomíneos que habitam regiões endêmicas para LC possuem uma menor quantidade de proteínas que causam a vasodilatação dos vasos periféricos, com isso os parasitos ficam mais limitados à derme do hospedeiro. Já em regiões onde há uma predominância de LV, a quantidade dessas proteínas encontradas na saliva é maior e, ao serem inoculadas durante o repasto sanguíneo desses insetos, resultam em dilatação dos vasos presentes na derme e maior distribuição dos parasitos para os órgãos viscerais (WARBURG *et al.*, 1994).

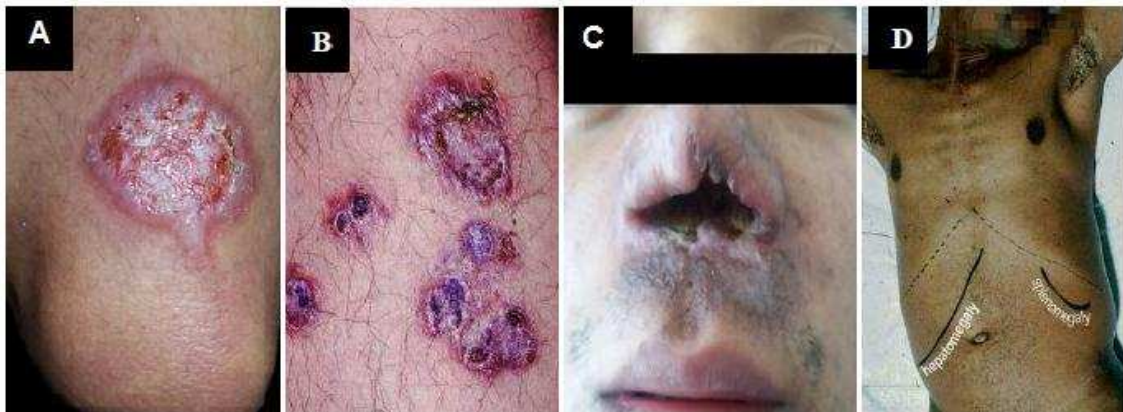


Figura 4: Manifestações clínicas das leishmanioses. (A) LC caracterizada por uma lesão ulcerativa típica no local de inoculação do parasito pelo inseto vetor. (B) LCD caracterizada por lesões de tamanhos variados com aparência verrucosa e xantomatosa na superfície corporal. (C) LMC decorrente da metástase para a mucosa nasal. (D) LV com visível hepatomegalia e esplenomegalia. Adaptado de: BIFELD, E.; CLOS, J. The genetics of *Leishmania* virulence. **Medical Microbiology and Immunology**; v. 204, n.6, p. 619–634, 2015 / LINDOSO, J.A.L.; CUNHA, M.A.; QUEIROZ, I. T.; MOREIRA, C. H. V. Leishmaniasis–HIV coinfection: current challenges. **Dovepress**; n. 8, p. 147–156, 2016; <http://dx.doi.org/10.2147/HIV.S93789>

2.4 Epidemiologia e urbanização da LV

A Leishmaniose Visceral (LV) está amplamente distribuída em 98 países, com mais de 350 milhões de pessoas em risco. Anualmente ocorrem aproximadamente 300.000 casos, e destes, mais de 20.000 são fatais, o que torna a LV a segunda doença mais grave causada por protozoário, número menor somente que aqueles apresentados pela malária (ALVAR *et al.*, 2012; WHO, 2016).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) coloca a LV como a 9^a doença infecciosa mais importante do mundo em razão das mortes prematuras, horas de trabalho perdidas, gastos com tratamentos, dentre outros efeitos deletérios causados por essa enfermidade sobre uma população (DESJEUX, 2004; WHO, 2010).

Além disso, esses dados são só uma estimativa da gravidade da incidência e taxa de letalidade da LV, porque apenas dois terços dos países endêmicos atualmente relatam oficialmente a incidência dessa patologia, podendo então a real gravidade ser um número bem maior do que o registrado (ALVAR *et al.*, 2012).

A LV afeta principalmente a população da África, Ásia e América Latina e a gravidade da doença está associado ao nível socioeconômico da população, condições de residência precárias, desnutrição e sistema imunológico frágil, falhas no acesso ao tratamento e medidas de prevenção, migração de áreas endêmicas para áreas não endêmicas e as condições ambientais favoráveis para a proliferação do inseto vetor (ALVAR *et al.*, 2006; READY, 2014).

O Brasil é o país mais afetado pela LV na América Latina, com aproximadamente 97% dos casos humanos (LARA-SILVA *et al.*, 2015). O número de casos tem se expandido rapidamente nas últimas três décadas, o que foi associado à mudança na epidemiologia da doença durante o período de tempo e esse fenômeno foi chamado de urbanização da doença, uma vez que a maioria dos casos ocorreu em grandes cidades em contraste com o fato de ser uma endemia tipicamente rural, como se acreditava anteriormente (GONTIJO; MELO, 2004; HARHAY *et al.*, 2011; COSTA, 2008). Mais de 70% dos casos ocorrem em 200 municípios, sendo que um quarto deles possuem mais de 100.000 habitantes, incluindo Aracaju (Sergipe), Araguaína (Tocantins), Bauru (São Paulo), Belo Horizonte (Minas Gerais), Campo Grande (Mato Grosso do Sul),

Fortaleza (Ceará), Montes Claros, (Minas Gerais), São Luís, (Maranhão) e Teresina (Piauí) (WERNECK, 2016).

A urbanização da LV vem se tornando cada vez maior devido a alterações ambientais provocados pelo homem, como o desmatamento, crescimento urbano desordenado e a concomitante presença do inseto vetor com animais domésticos (CELIO; MARZOCHI, 2016; BARATA *et al.*, 2013).

Outro aspecto epidemiológico importante dessa parasitose, e que está diretamente relacionado com a urbanização da doença, consiste no fato de que as fêmeas dos flebotomíneos se alimentam tanto de sangue de animais silvestres como de mamíferos que habitam regiões urbanas, principalmente o cão e o ser humano. Os animais silvestres são picados por insetos peridomiciliares, se tornando um elo importante para a transmissão para os cães e o homem. Os cães são importantes reservatórios no ciclo doméstico da LV e são considerados a principal fonte de infecção dos flebotomíneos devido à intensa carga parasitária na pele. Além disso, a proximidade do cão doméstico com os humanos facilita a transmissão nas áreas urbanas. Sendo assim, a LV, que era primariamente considerada uma zoonose de caráter rural, tornou-se um crescente problema de saúde pública (BARATA *et al.*, 2013).

Estudos epidemiológicos dos últimos anos mostram que Minas Gerais foi o estado com a maior proporção de casos que resultaram em óbito por LV no Brasil, superando os estados da região nordeste, que anteriormente era considerada a região mais endêmica do país (BARATA *et al.*, 2013; MARTINS-MELO *et al.*, 2014). Na capital Belo Horizonte, entre os anos de 2006 e 2014 a incidência de LV aumentou de 1,6 para 5,5 casos a cada 100.000 habitantes e os casos fatais variaram de 12,8 a 21,4%. No mesmo período, aumentou de 3,2 para 13,9% a soropositividade de cães infectados por *L. infantum chagasi*. Os aumentos registrados coincidem com a abundância do *Lu. longipalpis* nos ambientes intra e peridomiciliares (VIANNA *et al.*, 2016). Outra região de grande concentração de casos é o Norte do Estado. O município de Montes Claros, por exemplo, possui alta prevalência de cães infectados e alta densidade populacional do inseto vetor. As condições climáticas do local também contribuem para que essa região seja considerada uma área ativa de transmissão de LV. No período entre 2007 e 2009 foram registrados 95 casos de leishmaniose visceral humana, sendo 6 casos fatais (MICHALSKY *et al.*, 2009; PRADO *et al.*, 2011).

Em razão das características epidemiológicas e do conhecimento ainda insuficiente sobre os vários elementos que compõem a cadeia de transmissão da LV no Brasil, associados a questões de ordem operacional, as estratégias de controle desta endemia têm se mostrado pouco efetivas. Estas estratégias estão centradas no diagnóstico e no tratamento precoce dos casos humanos, assim como na redução da população de flebotomíneos vetores, na eliminação dos reservatórios domésticos e nas atividades de educação em saúde (BRASIL, 2014b).

2.5 Resposta imunológica na LV

Na LV os agentes etiológicos são protozoários parasitas intracelulares obrigatórios que tendem a se disseminar para o fígado, baço, medula óssea e linfonodos do hospedeiro e são as diferenças fisiológicas e morfológicas entre esses órgãos que fazem com que a resposta imune seja órgão-específica. O baço desempenha uma função central, pois se encontra infectado em todos os casos de leishmaniose e diferente de outros órgãos como o fígado, onde o crescimento do parasito acontece rapidamente e com poucas semanas ocorre resolução espontânea, no baço a infecção é mantida durante todo o curso da doença, onde a replicação dos parasitos começa tarde e ocorre lentamente, servindo como um abrigo seguro para a persistência em longo prazo das espécies de *Leishmania* que infectam órgãos viscerais (CUNNINGHAM *et al.*, 2002; WILSON *et al.*, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2016b; DE FREITAS *et al.*, 2016). O índice esplênico de parasitismo é usado como critério clínico de resposta terapêutica na LV humana, pois durante o curso da doença, o baço se torna um local evidente de interação entre o sistema imunológico e o parasito, uma vez que todos os participantes obrigatórios da resposta imune contra o parasito estão presentes em grandes quantidades nesse órgão. Entre eles podem-se citar os antígenos, as células apresentadoras de antígenos e os linfócitos que respondem a estes antígenos (RODRIGUES *et al.*, 2016b; SANTANA *et al.*, 2008).

O fígado também é um dos principais órgãos acometidos pela LV, causando diversas mudanças morfológicas nas células de Kupfer (KCs), nos hepatócitos, nas células de Ito, no espaço porta, nos sinusoides e nas veias hepáticas. Essas alterações levam também a distúrbios funcionais, como presença de infiltrado inflamatório periportal com a presença de macrófagos, linfócitos e plasmócitos, hipertrofia e

hiperplasia das células de Kupfer, congestão, degeneração hidrópica (também chamada de baloniforme), formação de granulomas na região portal e intralobular, fibrose e hepatite (EL HAG *et al.*, 1994; SANT'ANA *et al.*, 2007; VIDAL *et al.*, 2009). A infecção é controlada com a formação de granulomas inflamatórios, formados a partir do recrutamento de monócitos, neutrófilos e células T que se aglomeram em torno das KCs infectadas. As células imunes recrutadas produzem citocinas pró-inflamatórias que ativam os mecanismos leishmanicidas das KCs (FALEIRO *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2016b; DE FREITAS *et al.*, 2016).

Durante qualquer infecção parasitária, o sistema imune tenta controlar tanto o número de parasitos presentes no organismo quanto a resistência à reinfecção, porém ele pode também induzir a uma patologia associada ao parasitismo (ABBAS *et al.*, 2005). Parasitos do gênero *Leishmania* desenvolveram mecanismos adaptativos únicos para assegurar sua sobrevivência em diversos ambientes devido ao seu ciclo de vida. Estes parasitos devem sobreviver tanto frente a condições adversas encontradas no sistema digestivo do vetor, quanto evitar a ação destrutiva do sistema imune do hospedeiro, enquanto permanecem na corrente sanguínea (CUNNINGHAM *et al.*, 2002).

Uma resposta imunológica celular considerada um padrão protetor contra as leishmanioses é uma resposta na qual ocorre ativação de linfócitos T “helper” 1 (Th1) e Th17, e um padrão de susceptibilidade à doença é a ativação de linfócitos Th2 e a resposta humoral (MUTISO *et al.*, 2013; DE FREITAS *et al.*, 2016). Além disso, na fase inicial da infecção, componentes da resposta imune inata exercem um papel essencial no controle da entrada do parasito no hospedeiro, bem como da sua proliferação (SATO *et al.*, 2014). De modo geral, o sistema imunológico do hospedeiro é ativado quando infectado e passa a responder positivamente em direção à eliminação do parasito. Entretanto, *Leishmania* utiliza mecanismos como (1) inativação do sistema complemento, (2) modificação do micro-ambiente intracelular, (3) modulação da produção de citocinas e quimiocinas e (4) interferência nos processos de migração e apoptose celulares, para evadir os eventos microbicidas do organismo hospedeiro (CASTELLANO, 2005).

As fêmeas dos flebotomíneos, ao realizar o repasto sanguíneo, inoculam no hospedeiro os parasitos e substâncias da saliva, que induzem uma resposta inflamatória

no local junto com o dano provocado pela picada. O sistema imune inato do hospedeiro é ativado, recrutando neutrófilos, células dendríticas (CDs), macrófagos, plaquetas e componentes do sistema complemento (SATO *et al.*, 2014). O sistema complemento é um dos principais mecanismos extracelulares de combate inicial a agentes externos e antes mesmo de ser inoculada no hospedeiro, ainda no estágio que se encontra no vetor, *Leishmania* sofre alterações na membrana quando passa da fase promastigota procíclica para a fase metacíclica infectante, onde ocorre principalmente o alongamento na estrutura do lipofosfoglicano (LPG) da membrana, impedindo assim, a inserção do complexo C5b-C9 (MAC) do sistema complemento do hospedeiro à membrana do parasito (MCCONVILLE *et al.*, 1992; PUENTES *et al.*, 1990). Além disso, durante o desenvolvimento das formas procíclicas, ocorre uma maior expressão das moléculas de gp63 (glicoproteína de superfície de 63kDa), que são responsáveis por clivar a molécula C3b em C3bi, sua forma inativa, impedindo, também, a formação do MAC do sistema complemento (BRITTINGHAM *et al.*, 1995).

Após escaparem da ação da resposta imune inata, os parasitos devem invadir rapidamente a célula-alvo e iniciar a fase intracelular da infecção. *Leishmania* vive preferencialmente em macrófagos, tendo como algumas exceções fibroblastos, CDs e neutrófilos (RITTIG MG; BOGDAN C, 2000). Como não consegue penetrar ativamente, ela passa a depender da ação fagocítica das células, principalmente pela interação entre receptores celulares do hospedeiro (CR1, CR3, manose-fucose) e moléculas de superfície do microorganismo (principalmente LPG e gp63) (ZAMBRANO-VILLA *et al.*, 2002). Durante a fase inicial da infecção intracelular, a molécula de LPG seria responsável por inibir a fusão do fagossomo contendo o parasito com os lisossomos contendo enzimas líticas, pelo fato de inibir a maturação do fagossomo (DERMINE *et al.*, 2000; DESJARDINS; DESCOTEAUX, 1997), enquanto que a gp63 ficaria responsável por inativar as enzimas do lisossomo, caso a fusão com o fagossomo ocorresse (PESSOA; BARRETO, 1948). A ligação aos receptores do complemento não ativa os mecanismos oxidativos microbicidas do fagócito (WRIGHT; SIVERSTEIN, 1983), facilitando, assim, a entrada do parasito na célula-alvo (BHATTACHARYA; ALI, 2013).

Uma vez que a vida intracelular é estabelecida no fagossomo, os parasitos modulam o micro-ambiente para facilitar o estabelecimento da infecção (CASTELLANO, 2005). As formas promastigotas iniciam a transformação em

amastigotas, que são formas mais adaptadas ao pH ácido do meio e que possuem enzimas como a catalase e a superóxido dismutase em grandes concentrações, que protegem o parasito da explosão oxidativa dos macrófagos. Porém, antes de se transformar em amastigotas, as formas promastigotas necessitam da ação de LPG e gp63 na inibição da proteína quinase C (PKC) e na diminuição da sua translocação até a membrana (GIORGIONE *et al.*, 1996; MOORE *et al.*, 1993; OLIVIER *et al.*, 1992). A PKC e as proteínas tirosina quinase (PTK) estão relacionadas com a regulação da ação microbicida dos fagócitos, ou seja, quando essas enzimas são ativadas, elas produzem intermediários reativos do oxigênio (NATHAN; SHILOH, 2000).

Outra forma de controle de infecção exercida por macrófagos infectados é a ativação de células T efectoras por meio da apresentação de antígenos e fatores co-estimuladores aos linfócitos (CASTELLANO, 2005). A imunidade celular adquirida, juntamente com a imunidade inata, atua como fonte de citocinas, que estão envolvidas tanto na proteção quanto na patogênese da LV (BHATTACHARYA; ALI, 2013). A resolução da infecção está associada ao perfil de resposta Th1 e Th17, enquanto a susceptibilidade e a progressão da doença estão associadas ao perfil de resposta Th2 e a resposta humoral (DE FREITAS *et al.*, 2016). A interleucina 12 (IL-12) é o principal indutor da diferenciação de células T em Th1, sendo assim, considerada essencial para o desenvolvimento de uma resposta imune efetiva contra patógenos intracelulares. A ativação das células Th1 resulta na produção de interleucina-2 (IL-2), IFN- γ , linfotóxina alfa (LT α) e Fator de Necrose Tumoral (TNF). Essas citocinas proinflamatórias, juntamente com o TNF também produzido pelos próprios macrófagos infectados, ativam as vias microbicidas nos vacúolos parasitóforos do macrófago, tais como a produção de óxido nítrico pela ação da enzima NO sintetase induzível (iNOS) sobre o substrato L-arginina, que controla a proliferação das formas amastigotas internalizadas nos macrófagos e, conseqüentemente, auxilia na resolução da infecção (GRADONI; ASCENZI, 2004; FALEIRO *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2016b).

Assim sendo, uma forma eficiente de se escapar da destruição pelo sistema de defesa do hospedeiro passa a ser o controle da expressão de IL-12 pelo parasito. Estudos foram direcionados a observar se *Leishmania* era capaz dessa regulação e foi demonstrado que tanto o parasito quanto moléculas LPG e glico-inositol-fosfolípideo (GIPL) isoladas do parasito são capazes de inibir de forma seletiva a produção de IL-12, sem inibirem a produção de outras citocinas e que a inibição da síntese de IL-12 está

intimamente relacionada com a inibição da via Jak-STAT (*Janus kinase-signal transducers and activators of transcription*). A fosforilação defeituosa de Jak2 está atribuída a uma rápida ativação da proteína citoplasmática tirosina-fosfatase (PTP), denominada SHP-1 e foi demonstrado que os macrófagos eliminavam a infecção por *L. major* em animais deficientes de SHP-1, indicando que a ativação de SHP-1 é necessária para a sobrevivência da *Leishmania* em macrófagos (MCDOWELL; SACKS, 1999; BLANCHETTE *et al.*, 1999; FORGET *et al.*, 2001).

Durante a infecção no baço, as CDs secretam citocinas como a interleucina-6 (IL-6) e interleucina-23 (IL-23) que promovem a diferenciação de células Th0 em células T CD4+ efectoras com padrão Th17 e estas células produzem a interleucina-17 (IL-17), que contribui com a migração, recrutamento e ativação de neutrófilos para o local da infecção (RODRIGUES *et al.*, 2016b; BHATTACHARYA; ALI, 2013). Além disso, a ligação da IL-17 ao seu receptor IL-17R desencadeia uma cascata bioquímica de sinalização, que leva à ativação dos fatores de transcrição Fator Nuclear Kappa B (NF- κ B) e Ativador de Proteína 1 (AP1), que são importantes mediadores das atividades de genes que codificam moléculas pró-inflamatórias relacionadas com a resistência contra a *Leishmania* (AWANE *et al.* 1999; SCHWANDER; YAMAGUCHI, 2000).

A interleucina-4 (IL-4) é a principal citocina do perfil de resposta Th2, sendo responsável pela diferenciação e ativação de linfócitos Th0 em Th2 e, conseqüentemente, pelo direcionamento da resposta imune para uma resposta humoral, e, por isso, a IL-4 foi considerada como um marcador ativo da LV (BHATTACHARYA; ALI, 2013; FALEIRO *et al.*, 2014). Os macrófagos também sofrem a ação de citocinas moduladoras anti-inflamatórias como a IL-10 e o Fator de Transformação do Crescimento-Beta (TGF- β), que em outros modelos de infecções experimentais (como por *T. cruzi* e *Toxoplasma gondii*) têm papel importante na regulação da parasitemia e da resposta inflamatória (SACKS; SHER, 2002). Estudos indicam que a superprodução destas citocinas exerce um papel fundamental na supressão imune, na persistência do parasito e na cronificação da doença, dificultando a cura das lesões (BARRAL *et al.*, 1993; KANE; MOSSER, 2001; RODRIGUES *et al.*, 1998). Durante a LV, a IL-10 pode ser produzida por vários tipos celulares incluindo células T CD4+ e CD8+, macrófagos, células *Natural Killer* (NK) e CDs e age desativando as vias microbicidas dos macrófagos, diminuindo a expressão de MHC e de

moléculas co-estimuladoras, além de inibir a produção de IFN- γ (RODRIGUES *et al.*, 2016b; DE FREITAS *et al.*, 2016).

É importante ressaltar que por inúmeras pesquisas ao longo dos anos foi estabelecido que o padrão de resposta imune Th1 está relacionado com a proteção e que Th2 está relacionado com a susceptibilidade da leishmaniose. No entanto, em alguns trabalhos recentes tem se observado que a eficácia protetora de algumas vacinas está relacionada a um perfil misto de resposta Th1/Th2 ou com um balanço entre as citocinas pró-inflamatórias IFN- γ /TNF e as citocinas IL-10 e IL-4 em infecções por parasitos das espécies *L. donovani* e *L. major* (SINGH *et al.*, 2012; STOBER *et al.*, 2005; LOEUILLET *et al.*, 2016). Atualmente o que se entende é que o controle da doença está realmente relacionado com a ação de resposta Th1, mas que a susceptibilidade não está associada tão somente com a presença de resposta Th2, mas sim com a deficiência de resposta Th1, diferentemente do observado em camundongos BALB/c, que são altamente susceptíveis por produzirem quantidades exageradas de IL-4 frente à infecção por *L. major* ou pela produção de IL-10. Com isso, podemos observar que na LV ativa, a presença de IL-10 pode estar relacionada tanto com a resposta protetora por modular a resposta Th1, quanto no envolvimento na patogênese da doença, se sua produção não for controlada (SINGH *et al.*, 2012).

A infecção por *Leishmania* também é capaz de evitar que a célula parasitada entre em apoptose, ao ativar homólogos de Bcl-2 (MOORE *et al.*, 1994), além de diminuir a expressão de moléculas de complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II, por meio da ação de glicosil-inositolfosfolípidos (REINER *et al.*, 1987). A forma amastigota consegue internalizar e degradar moléculas MHC-II, além de diminuir a expressão de moléculas acessórias de sinalização do macrófago como B7-1 (KAYE *et al.*, 1994). Essa degradação de moléculas que participam da apresentação de antígenos aos demais componentes efetores do sistema imune do hospedeiro dificulta a amplificação da resposta anti-*Leishmania*, ajudando no escape do parasito e na manutenção da infecção. Percebe-se então, que a *Leishmania* evoluiu de maneira a explorar o sistema imune do próprio hospedeiro, modulando-o e proporcionando um ambiente aparentemente hostil para o estabelecimento da infecção. O desequilíbrio da relação parasito-hospedeiro seria a causa tanto da eliminação da infecção, quanto do processo patogênico nas leishmanioses (CASTELLANO, 2005).

2.6 Controle da LV

Os esforços para controle de LV incluem o tratamento de casos humanos, os inseticidas em residências e a eutanásia de cães infectados, sendo esta última, a medida de controle oficial no Brasil, conforme Decreto do Senado Federal nº 51.838 de 14 de março de 1963. Contudo, não se obteve com esta medida uma redução significativa na incidência da doença em humanos e cães e a mesma também demonstrou ser insuficiente para prevenir novas epidemias no Brasil, que ressurgiram a partir de 1992 (PALATNIK-DE-SOUSA *et al.*, 2001; BRASIL, 2015b; WERNECK *et al.*, 2002).

Historicamente, a quimioterapia para leishmanioses baseia-se no uso de medicamentos antimoniais pentavalentes como fármacos de primeira linha contra a doença, tais como antimoniato de N-metilglucamina, que é uma das drogas mais amplamente utilizada. No entanto, o mecanismo de ação desses antimoniais ainda não é bem compreendido. Provavelmente esses fármacos agem de forma multifatorial sobre os processos moleculares do parasito de modo a influenciar a atividade microbicida dos macrófagos, mas a utilização destas drogas tem sido limitada devido à ocorrência de efeitos colaterais graves como nefrotoxicidade, cardiotoxicidade, indução de pancreatite e ainda provoca alta incidência de recorrência da doença devido à resistência do parasito (FREZARD *et al.*, 2009; GARCIA BUSTOS *et al.*, 2014; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; NO, 2016).

Outros fármacos utilizados como segundas opções de tratamento são a pentamidina, a anfotericina B, a miltefosina e a paromomicina. A pentamidina atua interferindo na síntese de DNA, RNA, fosfolipídeos e proteínas do parasito, o que resulta em alteração na morfologia do cinetoplasto e fragmentação da membrana mitocondrial, mas tem uma toxicidade elevada. A anfotericina B possui uma ótima atividade leishmanicida, com taxas de cura elevadas de acordo com estudos realizados em áreas endêmicas para LV. Nos últimos anos tem-se utilizado uma formulação lipossomal (AmBisome[®]) administrada via intravenosa, com uma taxa de cura de 95%. O modelo mais aceito de ação desse fármaco mostra a formação de poros na membrana do parasito que permitem a passagem de água, íons e moléculas de glicose, levando-o à morte, além de ter efeitos moduladores de resposta imune, como aumento da produção de citocinas pro-inflamatórias e indução de proliferação de células T efetoras. Apesar disso, o uso da anfotericina B é limitado devido a efeitos secundários como

hematotoxicidade e nefrotoxicidade. A miltefosina, que foi desenvolvida inicialmente para o tratamento do câncer, é o primeiro fármaco oral eficaz para o tratamento da LV em humanos. Ele age por meio da modulação de receptores presentes na superfície do parasito que levam á apoptose desse protozoário, mas sua principal limitação é a teratogenicidade, e isso impede seu uso em mulheres em idade fértil. Já a paromomicina atua modificando a fluidez de membrana do parasito, interferindo na função dos ribossomos e no potencial da membrana mitocondrial de *Leishmania*, mas o efeito colateral mais comum associado a esse fármaco é a ototoxicidade, bem como problemas de função hepática (CROFT *et al.*, 2006; CROFT; COOMBS, 2003; OUELLETTE *et al.*, 2004; MONZOTE, 2009; ROATT *et al.*, 2014; NO, 2016; MEHEUS *et al.*, 2010).

No geral, além de causar diversos efeitos colaterais, a quimioterapia contra as leishmanioses também possui outro problema: é um procedimento caro, o que é fator limitante no tratamento de pacientes em países subdesenvolvidos. Por isso, outras alternativas vêm sendo buscadas, como por exemplo a terapia de combinação, assim como intensas pesquisas no âmbito vacinal relacionadas com a busca pela caracterização de moléculas parasitárias específicas com potencial imunogênico. A vacina pode se tornar o método mais eficaz de controle da LV, pois diversos candidatos vacinais já foram testadas com êxito, em estudos *in vitro* e *in vivo*. Já existem duas vacinas licenciadas pelo Ministério da Saúde e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) contra a Leishmaniose Visceral Canina (LVC): a Leish-Tec[®] e a Leishmune[®], mas ainda não há uma vacina de formulação licenciada disponível para humanos. Porém candidatos vacinais em fases I (segurança) e II (imunogenicidade) estão sendo usados para ensaios clínicos em humanos, chamados Leish-F1 e Leish-F2 (MONGE-MAILLO; LOPEZ-VELEZ, 2013; CIFANI *et al.*, 2012; BIFELD; CLOS, 2015; FERNANDES *et al.*, 2008, GILLESPIE *et al.*, 2016).

As vacinas mais estudadas utilizam como antígenos: o parasito vivo atenuado ou morto (primeira geração), as moléculas de *Leishmania* que sejam imunogênicas ou que sejam importantes para virulência do parasito (segunda geração), o DNA que codifica as proteínas da *Leishmania* (terceira geração) e os imunomoduladores. Os principais desafios no desenvolvimento de vacinas contra a leishmaniose são a complexidade associada à antigenicidade, resposta desigual ao hospedeiro, variabilidade nas diferentes espécies de *Leishmania* e custo associado ao desenvolvimento (ABDIAN *et al.*, 2011, ARAÚJO *et al.*, 2011; SINGH; SUNDAR, 2012).

As vacinas de primeira geração são consideradas padrão ouro para proteção contra doenças causadas por parasitos intracelulares. A utilização de parasitos vivos atenuados é importante na vacinação devido à mimetização do curso natural da doença, permitindo que todo o espectro de antígenos seja apresentado para o sistema imunológico de maneira semelhante à que ocorre quando o parasito infecta em condições naturais. Os processos que têm sido utilizados para produzir *Leishmania* atenuada são altas passagens em meios de cultura, seleção por sensibilidade à temperatura, mutagênese química e irradiação. Apesar do índice eficaz de proteção fornecida por esse tipo de vacina, sua utilização para uso humano encontra limitações graças à possibilidade de reativação em indivíduos imunossuprimidos, de provocar respostas imunes variáveis em seres humanos e ainda o parasito poder sofrer mutações genéticas aleatórias, levando à redução da imunidade protetora caso o protozoário não resista em tempo suficiente para a montagem de uma reposta imune prolongada ou por provocar a perda de importantes epítomos. Já a utilização de parasitos mortos para a produção de vacina pode parecer uma alternativa mais segura e eficaz. No entanto, não é capaz de mimetizar uma infecção natural como a atenuada e é menos imunogênica (SRIVASTAVA *et al.*, 2016; NOAZIN *et al.*, 2008; CHOUDHURY *et al.*, 2013).

Os investimentos em Biotecnologia nas últimas décadas permitiram o desenvolvimento de uma segunda geração de vacinas molecularmente bem definidas e com a vantagem de serem potencialmente mais seguras do que aquelas produzidas a partir de micro-organismos vivos atenuados (ELLIS, 1990; CHEN *et al.*, 1994).

As vacinas de segunda geração são formuladas a partir de subunidades purificadas ou recombinantes do parasito, como: moléculas imunogênicas presentes na superfície de *Leishmania* capazes de gerar uma resposta imune protetora, moléculas relacionadas à virulência do parasito, que uma vez bloqueadas pelo sistema imune ativado, pode ter sua função comprometida, resultando na interrupção da infecção e ainda combinações de moléculas imunogênicas e/ou relacionadas à virulência do parasito, com o poder de aumentar o potencial protetor da vacina. Muitas moléculas antigênicas de *Leishmania* são estudadas para o desenvolvimento desse tipo de vacina, como o antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) (HERAVI SHARGH *et al.*, 2012; FIROUZMAND *et al.*, 2013; CHAMAKH-AYARI *et al.*, 2014), a enzima esterol metiltransferase (SMT) responsável pela produção de esterol da membrana do parasito (GOTO *et al.*, 2009), as enzimas que participam do catabolismo de ATP extracelular (DE ALMEIDA MARQUES-DA-

SILVA *et al.*, 2008), o lipofosfoglicano (LPG) (SRIVASTAVA *et al.*, 2013; MARTÍNEZ SALAZAR *et al.*, 2014), a proteína homóloga de *Leishmania* de receptores de proteína quinase C ativada (LACK) (GONZALEZ-ASEGUINOLAZA *et al.*, 1999; MARQUES-DA-SILVA *et al.*, 2005; MOUGNEAU *et al.*, 1995), a glicoproteína gp63 (OLIVIER *et al.*, 2012; BRITTINGHAM; MOSSER, 1996; HANDMAN; BULLEN, 2002; LO *et al.*, 1998; SPATH *et al.*, 2003), as cisteinopeptidases (ALEXANDER *et al.*, 1998; BUXBAUM *et al.*, 2003; DENISE *et al.*, 2003), ligante de fucose e manose (FML) (PALATNIK-DE-SOUSA *et al.*, 2008; PALATNIK-DE-SOUSA *et al.*, 2009), o fator 17 de virulência A2 (GHOSH *et al.*, 2001; MCCALL; MATLASHEWSKI, 2010; MCCALL; MATLASHEWSKI, 2012), a KMP-11, proteína 11 da membrana do cinetoplasto (DE MENDONÇA; CYSNEFINKELSTEIN; MATOS, 2015), a proteína ribossomal (PO) (PEREIRA *et al.*, 2015), dentre vários outros antígenos purificados de *Leishmania* (JAIN; JAIN, 2015). As vacinas licenciadas pelo Ministério da Saúde para LVC são exemplos de segunda geração: A Leish-Tec[®] é uma vacina recombinante tendo o antígeno A2 de amastigotas de *Leishmania* em sua formulação e a Leishmune[®] é composta de frações do ligante de manose-fucose (FML) de *L. donovani* com a adição do adjuvante saponina (SAP) (FERNANDES *et al.*, 2008; BORJA-CABRERA *et al.*, 2008; MOREIRA *et al.*, 2016). Vale ressaltar que as vacinas para LVC são de extrema importância para o controle da LV, uma vez que podem proporcionar a interrupção do ciclo do parasito que tem o cão como reservatório nos ambientes urbanos e periurbanos (GRADONI, 2015).

Já as vacinas de terceira geração utilizam as informações genéticas dos parasitos, e são produzidas pela inserção de genes ou fragmentos de genes que codificam antígenos imunogênicos em DNA plasmidial ou em vetores virais (MARQUES-DA-SILVA *et al.*, 2005; PASSERO *et al.*, 2012a; COSTA *et al.*, 2014; JAIN; JAIN, 2015). A principal vantagem da vacina de DNA é a indução da produção de anticorpos e de resposta imune celular (linfócitos T auxiliares CD4⁺ e T citotóxico CD8⁺), assim como as vacinas atenuadas (VAN TIENHOVEN *et al.*, 2001, NAGATA *et al.*, 2004). Porém, também existem riscos como a integração do plasmídeo ao genoma hospedeiro, podendo gerar mutações (HENKE, 2002).

O uso conjunto de adjuvantes com as moléculas imunogênicas candidatas a vacinas muitas vezes é essencial para a obtenção de uma resposta imune intensa e duradoura. Para escolher um adjuvante adequado devem-se levar em consideração

alguns fatores, como a natureza do antígeno, o tipo de resposta imune desejada, em qual via a vacina vai ser administrada e o calendário das imunizações (DE JESUS PEREIRA *et al.*, 2015; SRIVASTAVA *et al.*, 2016). O adjuvante saponina é caracterizado por induzir uma intensa resposta imune do tipo Th1 e produção de linfócitos T citotóxicos contra antígenos exógenos, produção de IgG2a em camundongos, bem como concomitante resposta Th2. É ideal em vacinas formuladas a partir de subunidades do patógeno, em vacinas direcionadas a patógenos intracelulares e em vacinas terapêuticas contra o câncer (LIU *et al.*, 2002; SUN; XIE; YE, 2009). O Adjuvante Incompleto de Freund (AIF) é outro adjuvante utilizado em formulações vacinais e é caracterizado por estimular resposta humoral e também por ser capaz de estimular um padrão misto de citocinas anti/pro-inflamatórias como IL-4/IFN- γ , justificando a sua utilização para a obtenção de um padrão misto que pode proteger contra a LV (FERNANDES *et al.*, 2014b; VITORIANO-SOUZA *et al.*, 2012).

2.7 Lectinas e sua utilização como imunógeno

Como dito anteriormente, o parasito possui várias moléculas consideradas fatores de virulência que estão envolvidas em processos infecciosos e que vem sendo utilizadas como imunógenos em vacinas de segunda geração (ABDIAN *et al.*, 2011; OLIVIER *et al.*, 2012). Um exemplo é a lectina, uma proteína amplamente encontrada em microrganismos, plantas e animais, que tem como principal característica a capacidade de se ligar de forma específica e reversível em carboidratos solúveis presentes em glicoproteínas e glicolipídeos (MARTINS *et al.*, 2015). Essa propriedade despertou o interesse sobre a possível participação das lectinas em processos infecciosos hoje já é sabido que as interações entre lectinas e carboidratos têm aplicações diretas sobre o sistema imunológico, tais como na opsonização e fagocitose de microrganismos, na adesão celular entre microrganismos patogênicos e seus hospedeiros, na ativação e diferenciação de células e no processo de apoptose (GEURTSEN *et al.*, 2009; PIPIROU *et al.*, 2011; VAN *et al.*, 2010; NI; TIZARD, 1996; KOMATH *et al.*, 2006).

Lectinas do tipo C estão presentes em macrófagos e células apresentadoras de antígenos e atuam como receptores de reconhecimento padrão (PRRs) capazes de reconhecer carboidratos específicos presentes na superfície do patógeno e, assim, desencadear uma resposta imune contra o antígeno (MCGREAL *et al.*, 2004). Lectina

isolada da alga *Griffithsia* sp se liga especificamente à proteína gp120 presente no envelope do vírus HIV, bloqueando a interação dessa proteína do vírus com o receptor CD4⁺ das células do hospedeiro e impedindo assim a infecção (OGAWA *et al.*, 2011). A lectina galectina-3 se liga a glicanos e assim, pode reconhecer padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) específicos de *L. major*, além de contribuir com a infiltração de neutrófilos para locais infectados e ajudar na redução da carga parasitária (SATO *et al.*, 2014). A lectina ArtinM, extraída da semente da jaca (*Artocarpus heterophyllus*), apresenta atividade imunomoduladora contra vários patógenos intracelulares (MARIANO *et al.*, 2014). A interação entre a ArtinM com receptor Toll do tipo2 (TLR2) em macrófagos e CDs resulta na produção de altos níveis de IL-12, impulsionando a imunidade para um padrão de resposta do tipo Th1 (COLTRI *et al.*, 2008), o que explica a capacidade de proteção conferida pela administração de ArtinM contra infecções por *L. major* (PANUNTO-CASTELO *et al.*, 2001), *L. amazonensis* (TEIXEIRA *et al.*, 2006), *Paracoccidioides brasiliensis* (COLTRI *et al.*, 2008; COLTRI *et al.*, 2010) *Neospora caninum* (CARDOSO *et al.*, 2011) e *Candida albicans* (LOYOLA *et al.*, 2012) em camundongos. Além de atuar em células apresentadoras de antígeno, ArtinM exerce atividades em outras células do sistema imune, com mastócitos (MORENO *et al.*, 2003; BARBOSA-LORENZI *et al.*, 2011), neutrófilos (PEREIRA-DA-SILVA *et al.*, 2006; TOLEDO *et al.*, 2009) e linfócitos (DA SILVA *et al.*, 2014). Isso explica a propriedade da ArtinM de conferir resistência contra patógenos intracelulares (SOUZA *et al.*, 2013). Lectinas também têm sido aplicadas como marcadores para investigar carboidratos da superfície de diferentes espécies e cepas de *Leishmania*, ajudando na distinção entre cepas patogênicas e não patogênicas, e entre estágios morfológicos distintos do parasito (ANDRADE; SARAIVA, 1999; GHOSHAL *et al.*, 2009).

A Proteína Ligante de Heparina (PLH) é uma lectina específica que se liga em glicosaminoglicanos (GAGs) como sulfato de heparano e sulfato de dermatano e em lipopolissacarídeo (LPS), moléculas presentes no tecido de hospedeiros (ALVES *et al.*, 2012; GAUTAM *et al.*, 2001). A PLH é capaz de matar bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e *C. albicans* (SHAFER *et al.*, 1984; SOEHNLEIN, 2009; MOSSER; EDWARDS, 2008), agindo na opsonização para melhorar a fagocitose desses patógenos (AMULIC *et al.*, 2012; TAPPER *et al.*, 2002). A PLH também pode estar presente no próprio parasito, como é encontrada na superfície de *Trypanosoma cruzi* e estão

envolvidas nos processos de adesão de amastigotas a células do hospedeiro e de epimastigotas ao epitélio intestinal de triatomíneos (BAMBINO-MEDEIROS *et al.*, 2011; OLIVEIRA, JR. *et al.*, 2008; OLIVEIRA, JR. *et al.*, 2012). Foi mostrado que a PLH também está presente nas espécies de *Leishmania* influenciando diretamente no ciclo de vida desses parasitos. Experimentos realizados com promastigotas de *Leishmania donovani* mostraram que aproximadamente 860.000 unidades destas proteínas estão localizadas na superfície do parasito e que elas são capazes de induzir a inibição da atividade da proteína quinase C no hospedeiro através de ligação à heparina (BUTCHER *et al.*, 1990; BUTCHER *et al.*, 1992). Além disso, a expressão de PLHs em *L. donovani* está relacionada com as formas infectantes deste parasito: PLHs são predominantes em promastigotas de fase estacionária e passagens de cultura sucessivas desses parasitos fazem com que a ligação à heparina seja perdida (KOCK *et al.*, 1997). A PLH também se mostrou presente em *L. (V.) braziliensis* participando na adesão do parasito no intestino médio dos insetos vetores pelo reconhecimento de moléculas presentes no intestino de *Lu. intermedia* e *Lu. whitmani* (DE CASTRO CORTES *et al.*, 2012a; DE CASTRO CORTES *et al.*, 2012b; AZEVEDO-PEREIRA *et al.*, 2007).

Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa vem trabalhando com uma proteína ligante de heparina presente em formas promastigotas de L. infantum chagasi (PLHLc) e já obtivemos resultados promissores provenientes de trabalhos realizados em laboratório. Primeiramente, foi revelada a presença da proteína ligante de heparina na superfície de formas promastigotas de L. infantum chagasi (PLHLc) utilizando técnica de purificação de proteínas por cromatografia líquida e por ensaios de imunomarcação e de microscopia eletrônica de transmissão utilizando anticorpos anti-PLHLc, que demonstraram a distribuição dessa lectina de forma homogênea pela superfície do parasito, em vacúolos citoplasmáticos e no citoplasma, sendo mais evidente próxima ao cinetoplasto. Para avaliar a participação da PLHLc nos processos de infecção do parasito in vitro, a lectina foi bloqueada com heparina resultando em redução parcial da internalização de Leishmania em cultura de macrófagos (MARTINS et al., 2015). Uma vez que a PLHLc pode ser implicada como um fator de virulência de L. infantum chagasi, o bloqueio de sua atividade pode diminuir a infecciosidade do parasito porque essa lectina está envolvida em processos de adesão do parasito à célula hospedeira e, ainda, pode ser utilizada como candidato vacinal para estimular a indução de reposta protetora contra infecções pelo sistema imunológico. A partir disso, foram realizados

experimentos in vivo que mostraram que a PLHLc nativa é imunogênica, visto que o balanço da produção de citocinas e de NO induziram uma resposta mista Th1/Th2 em imunização de camundongos BALB/c, perfil este relatado na literatura como sendo de proteção contra a LV. Também foi mostrada a eficácia protetora dessa proteína nativa em experimentos de imunização contra infecção por L. infantum chagasi em camundongos BALB/c. Para isso, foi quantificado o número de parasitos no baço e fígado de animais vacinados e desafiados com formas promastigotas de L. infantum chagasi, bem como também foi avaliado o perfil de citocinas produzidas e a produção de NO, que induziram um perfil de resposta Th1/Th17, que foi eficaz no controle da doença, uma vez que foi capaz de reduzir a carga parasitária no baço e no fígado dos animais experimentais (dados não publicados).

Esses resultados nos conduziram para uma nova etapa na investigação da PLHLc como candidata a vacina contra LV por intermédio de ensaios de imunogenicidade e proteção utilizando agora a proteína recombinante no preparo da formulação vacinal. É sabido que a tecnologia do DNA recombinante possibilita a produção de proteínas heterólogas em grande quantidade, sendo uma maneira muito mais eficaz de produção da proteína em teste, comparada ao protocolo de extração da proteína nativa dos parasitos, já que um dos impasses encontrado é o pouco rendimento obtido durante a purificação da proteína. Tivemos como objetivo então, testar se assim como a PLHLc nativa, a proteína recombinante ligante de hepatina de L. infantum chagasi (rPLHLc) também confere imunogenicidade e proteção contra infecção por L. infantum chagasi em camundongos BALB/c, com o objetivo final decomprovar seu uso efetivo na profilaxia contra a LV. Mais experimentos em paralelo estão sendo feitos em nosso laboratório no que diz respeito à caracterização da estrutura da PLHLc e a perspectiva futura é obter cada vez mais resultados positivos que possam validar a utilização da proteína recombinante para uso profilático contra LV, doença de grande importância na saúde pública.

3. OBJETIVOS

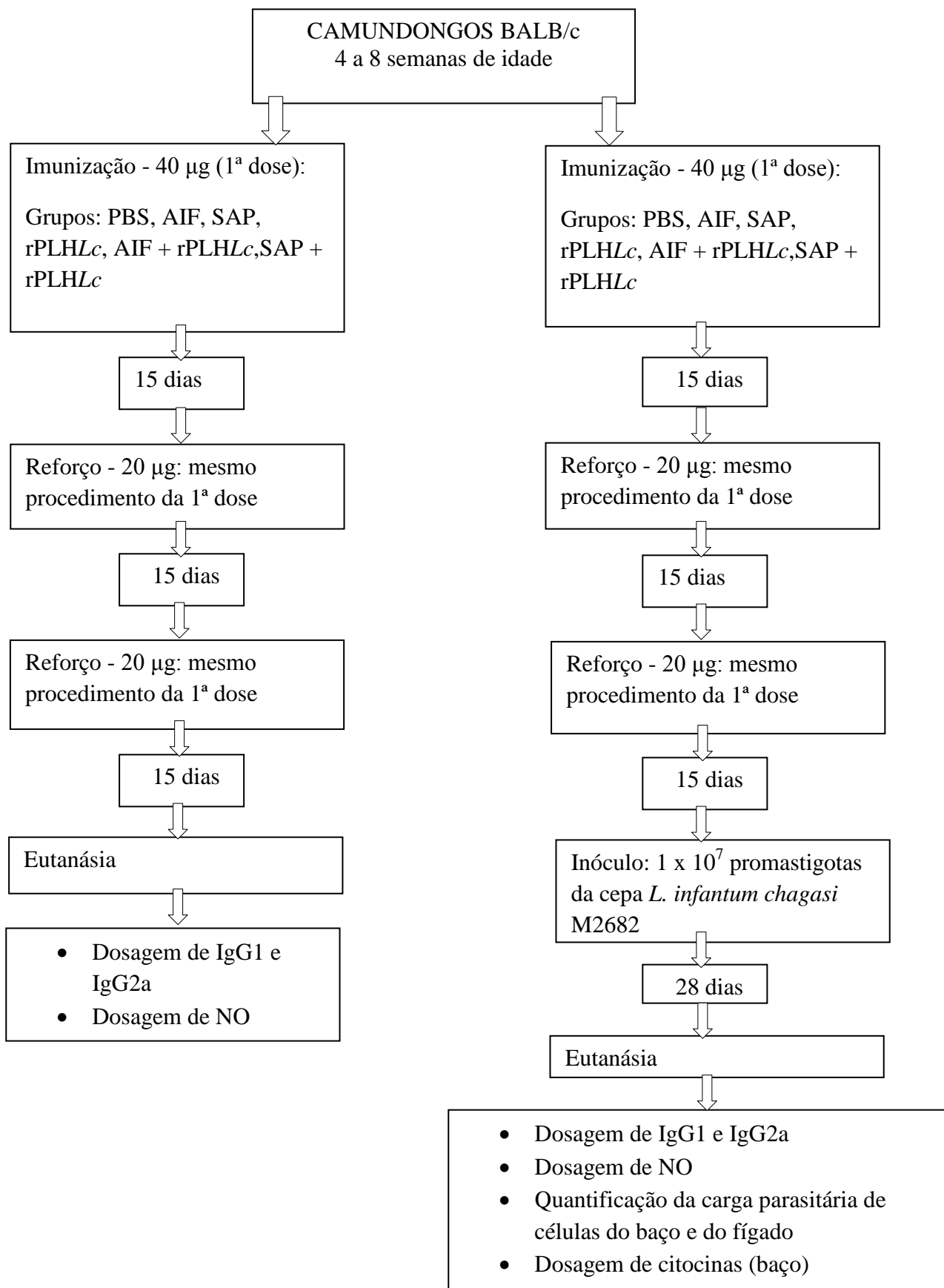
3.1 Objetivo geral

Avaliar a imunogenicidade e a proteção contra infecção por *L. infantum chagasi* após imunização de camundongos BALB/c com proteína recombinante ligante de heparina do parasito (rPLHLc).

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade de proteção da vacina contra infecção por *L. infantum chagasi* por meio da quantificação de parasitos no baço e no fígado de camundongos BALB/c após o desafio;
- Verificar o padrão esplênico de citocinas (IFN- γ , TNF, IL-2, IL-17, IL-6, IL-10 e IL-4) e de NO produzidos após desafio de camundongos BALB/c com formas promastigotas de *L. infantum chagasi*, previamente imunizados com rPLHLc na presença ou não de AIF ou SAP;
- Avaliar a resposta imunológica humoral anti-rPLHLc por meio da avaliação da produção das subclasses de imunoglobulinas IgG1 e IgG2a anti-rPLHLc no soro dos camundongos BALB/c após desafio dos camundongos BALB/c com formas promastigotas de *L. infantum chagasi*, previamente imunizados com rPLHLc na presença ou não de AIF ou SAP;
- Avaliar o padrão de produção de NO por cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c produzido após imunização com rPLHLc na presença ou não de AIF ou SAP;
- Avaliar a resposta imunológica humoral anti-rPLHLc por meio da avaliação da produção das subclasses de imunoglobulinas IgG1 e IgG2a anti-rPLHLc no soro dos camundongos BALB/c na presença ou não de AIF ou SAP.

4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 *Animal experimental*

Camundongos fêmeas BALB/c de 4 a 8 semanas de idade foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa – UFV, sendo mantidos e manuseados no biotério do setor de Imunologia e Virologia do Departamento de Biologia Geral – DBG/UFV, onde permaneceram em ciclo fotoperiódico claro/escuro de 12 h e receberam água e alimento *ad libidum*. A experimentação animal foi feita respeitando princípios éticos do Código Profissional do Médico Veterinário, de acordo com o parecer da Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA/UFV- Projeto de pesquisa processo número: 16/2016).

5.2 *Obtenção dos parasitos*

Formas promastigotas totais de *Leishmania infantum chagasi* cepa (MHOM/BR/75/M2682), mantidas em cultura, foram inoculadas em camundongos BALB/c (1×10^7 parasitos/100 μ L) em tampão PBS (Salina Tamponada com Fosfato), pH7,2, aplicados pela veia da cauda. 28 dias após a infecção, os animais foram eutanasiados e deles foram retirados o baço e o fígado, que foram macerados e diluídos em placa de 24 poços em diluições seriadas, em meio de Grace[®] (GIBCO BRL, Grand Island, N.Y., USA) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino Inativado a 57°C/30 min (SFB; LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil), L-glutamina 2 mM (GIBCO BRL) e penicilina G 100 U/mL (USB Corporation, Cleveland, OH, USA) – Grace completo. A placa foi mantida em estufa a 26°C. Parasitos provenientes dessa cultura foram recuperados, mantidos em crescimento em Grace completo e utilizados diretamente em experimentos posteriores ou estocados em nitrogênio líquido (-196°C).

5.3 Cultura dos parasitos

Os parasitos foram cultivados em meio Grace completo suplementado com hemina bovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) a 6,25 mg/L, pH 6,5, a 26 °C e com 10% de urina humana.

5.4 Obtenção do antígeno particulado de *L. infantum chagasi* (AgLc)

Para a obtenção do AgLc, foram utilizados precipitados de formas promastigotas crescidas em meio suplementado com hemina bovina (Sigma-Aldrich) a 6,25 mg/L, pH 6,5, a 26 °C e com 10% de urina humana, lavadas 3 vezes com PBS, pH 7,2. Precipitado correspondente a aproximadamente 1×10^7 parasitos foi suspenso em 3 mL de PBS, pH 7,2 e submetido a 17 ciclos de resfriamento em nitrogênio líquido (-120°C) e aquecimento a 37°C em banho-maria para o rompimento da membrana dos parasitos. Após os ciclos, o material foi visualizado ao microscópio ótico para a confirmação da lise dos parasitos e foi feita a dosagem de proteína do material pela técnica de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951). Em seguida, o material foi armazenado em freezer a -20°C.

5.5 Obtenção da rPLHLc

A rPLHLc utilizada nesse trabalho foi produzida anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa conforme protocolo descrito a seguir. A sequência de DNA codificante da rPLHLc foi sintetizada *in vitro* e inserida no vetor de clonagem pUC19 no sítio *NdeI* e *XhoI*. A construção gênica foi adicionada a bactérias competentes de propagação *Escherichia coli* cepa DH5α por choque térmico para a inserção do vetor. As células DH5α foram propagadas em placa contendo meio de cultura ágar sólido 1,8% em meio Luria Bertane (LB) adicionado de ampicilina. Colônia isolada contendo o inserto foi propagada em meio LB líquido adicionado de ampicilina. Para a análise do inserto foi realizada a extração do DNA plasmidial, dosagem e clivagem por enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*. Após a digestão, realizou-se corrida eletroforética em gel de agarose 0,8%. O produto da digestão foi extraído do gel e ligado em vetor de expressão pET 28a(+) (Novagen), contendo a His-Tag na porção N-terminal do polipeptídeo. Células *E. coli* cepa DH5α foram transformadas com o plasmídeo modificado para a propagação dos

vetores contendo a rPLHLc. A proteína recombinante foi expressa em células *E. coli* cepa Rosetta (DE3) transformadas com a construção pET 28, com expressão induzida por isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 0,5 mM em meio LB e sob incubação a 37°C por 4 h ou 18°C por 16 h sob agitação de 250 rpm. Ao final da indução da expressão as células foram centrifugadas a 5000 g/4°C/40 min e o precipitado ressuspendido em tampão fosfato de sódio 10 mM/cloreto de sódio 150 mM, pH 7,0 (tampão A). O produto foi sonicado em sonicador (Q-Sonica), na frequência de 6 KHz em oito ciclos de 30 segundos com intervalos de 30 segundos, sempre em banho de gelo. Todo o material resultante foi centrifugado a 12000 x g/4°C/30 min para recuperação do sobrenadante de proteínas solúveis.

A fração solúvel foi submetida à purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel Ni-NTA resin (Qiagen) equilibrado com tampão A, em que foram realizadas lavagens com imidazol 10 mM e as proteínas imobilizadas eluídas com tampão A + imidazol 500 mM. Os produtos proteicos foram analisados em eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) 10%. A fração proteica ligante de níquel foi submetida a uma nova cromatografia de afinidade em coluna de heparina-agarose. Para equilibrar e retirar o material não adsorvido à coluna foi utilizado tampão A. A fração adsorvida foi eluída com o mesmo tampão acrescido de NaCl 2 M. A purificação foi realizada em sistema automatizado FPLC (*Äkta Purifier*), com fluxo de 1 mL/min e monitorizada pela leitura de absorvância em 280 nm. O material eluído foi coletado e submetido a técnica de cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200 10/300GL (GE Healthcare Life Sciences) com fluxo de 0,5 mL/min, equilibrado com tampão fosfato de sódio 10 mM/cloreto de sódio 150 mM, pH 7,0, monitorizados por leitura de absorvância em 280 nm. A fração de interesse foi coletada e analisada por SDS-PAGE 12%, após coloração com Coomassie Blue. Por fim, a proteína foi dosada pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951), e armazenada em freezer a -20°C.

No que diz respeito aos dados da proteína, a análise de peptídeos feita no pBLAST implementada no Uniprot KB encontrou a maioria dos peptídeos identificados, revelando 15% de cobertura de seqüência em comparação com a proteína A4I4C9_LEIIN. Ao usar o pBLAST implementado no TritypDB, a seqüência do gene foi identificada como LinJ. 29.0790 - codificando uma proteína de choque térmico 90/LPG3 putativo. A PLHLc pode, portanto, ser identificado como a proteína LPG3.

5.6 Experimentos de imunização e infecção

O trabalho foi dividido em duas partes: teste de imunogenicidade e teste de desafio. Para cada teste foram utilizados 24 camundongos BALB/c por experimento. Foram realizados dois experimentos por teste, perfazendo o total de 96 animais utilizados. Cada experimento foi dividido em 6 grupos com 4 camundongos cada, escolhidos aleatoriamente. Todos os animais foram imunizados em 3 doses por via subcutânea (grupos que receberam SAP), e por via intraperitoneal (demais grupos), com intervalo de 15 dias entre cada dose. Foram utilizados 40 µg da rPLHLc na primeira dose e 20 µg nas doses de reforço nos grupos que receberam a proteína recombinante. Os 6 grupos utilizados foram, então: **Grupo ControlePBS** (200 µL de PBS, pH 7,2), **Grupo AIF** (100 µL de AIF emulsificado em 100 µL de PBS, pH 7,2), **Grupo SAP** (100 µL de SAP diluída em 100 µL de PBS, pH 7,2), **Grupo rPLHLc** (rPLHLc diluída em 100 µL de PBS + 100 µL de PBS, pH 7,2), **Grupo AIF + rPLHLc** (emulsão composta de rPLHLc diluída em 100 µL de PBS, pH 7,2 + 100 µL de AIF) e **Grupo SAP + rPLHLc** (rPLHLc diluída em 100 µL de PBS, pH 7,2 + 100 µL de SAP).

Para o teste de desafio, os animais além de imunizados foram infectados com 1×10^7 promastigotas de *L. infantum chagasi* em fase final logarítmica de crescimento (volume de inóculo: 200 µL em PBS, pH 7,2) na veia da cauda 15 dias após receberem a terceira dose de imunização.

5.7 Métodos de eutanásia

15 dias após a última dose de imunização no teste de imunogenicidade e 28 dias após a infecção no teste de desafio os camundongos foram eutanasiados, por pessoal devidamente treinado, utilizando a técnica de deslocamento cervical em substituição à utilização de barbitúricos ou outros anestésicos gerais injetáveis recomendados pela Resolução 714 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), visto que o uso de anestésicos pode interferir na resposta imune dos animais (THOMPSON *et al.*, 2002; MARKOVIC *et al.*, 1990).

5.8 Isolamento de células do baço/fígado para análise da carga parasitária dos camundongos infectados

Os camundongos utilizados para o teste de desafio foram eutanasiados e deles foram retirados o baço e o fígado em condições assépticas. O baço foi coletado inteiro, pesado e macerado em meio de lavagem de células, pH 7,2, constituído por DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) com bicarbonato de sódio, suplementado com 1% SFB inativado a 57°C/30 min (LGC Biotecnologia), penicilina G 100 U/mL (USB Corporation) e L-glutamina 2 mM (GIBCO BRL). A suspensão proveniente da maceração foi centrifugada a 42 x g/4°C/1 min em tubo de fundo cônico de 15 mL e 1/5 do sobrenadante da suspensão foi utilizado para a quantificação. Entre 50 e 100 mg do fígado foi coletado, pesado, macerado em meio de lavagem e a suspensão foi centrifugada a 42 x g/4°C/1 min em tubo de fundo cônico de 15 mL. O restante do fígado foi pesado para obtenção da massa total do órgão. A quantificação da carga parasitária foi realizada pela técnica da diluição limitante (MARQUES-DA-SILVA *et al.*, 2005). De acordo com essa técnica, os sobrenadantes provenientes da primeira centrifugação foram centrifugados novamente a 1540 x g/4°C/10 min e o sedimento ressuspenso em 500 µL de meio Grace completo, pH 6,5. O volume de 200 µL de cada suspensão foi distribuído, em duplicata, nos primeiros poços da placa de fundo chato de 96 poços. Nos demais poços foram adicionados 160 µL de meio Grace completo. A partir daí foram realizadas diluições 1:5, transferindo 40 µL de poço em poço, até o décimo segundo poço. As placas foram vedadas, mantidas em estufa a 26°C e durante 10 dias acompanhou-se a carga parasitária de todos os poços. Ao final, foi calculado o número de *Leishmania* por fragmento observando-se o último poço em que havia a presença do parasito. O resultado foi expresso como a média dos logaritmos do número de parasitos por miligrama de tecido do órgão.

5.9 Isolamento de células mononucleares do baço para dosagens de citocinas e de NO

As dosagens de citocinas e de NO foram realizadas a partir de sobrenadantes de culturas de esplenócitos. Para isso os baços dos animais foram retirados sob condições assépticas e macerados em meio de lavagem. A suspensão proveniente da maceração foi centrifugada a 42 x g/4°C/1 min em tubo de fundo cônico de 15 mL e o sobrenadante foi coletado em outro tubo. No teste de desafio, foi utilizado 4/5 do volume do

sobrenadante da suspensão proveniente da centrifugação do baço para dosagem de citocinas e de NO e no teste de imunogenicidade foi utilizado o volume inteiro do sobrenadante da suspensão do baço. A partir daí, o sobrenadante coletado foi centrifugado novamente a $170 \times g/4^{\circ}\text{C}/10$ min em tubo de fundo cônico de 15 mL. O sobrenadante dessa segunda centrifugação foi descartado e o precipitado ressuspenso em 2 mL de solução de lise de hemácias (Tris base 17 mM e cloreto de amônio 144 mM), pH 7,2. Após 2 minutos, foram adicionados 8 mL de meio de lavagem ao volume contido no tubo e este foi centrifugado a $170 \times g/4^{\circ}\text{C}/10$ min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 5 mL de meio DMEM (Sigma-Aldrich), pH 7,2, suplementado com 10% de SFB inativado a $57^{\circ}\text{C}/30$ min (LGC Biotecnologia), penicilina G 100 U/mL (USB Corporation) e L-glutamina 2 mM (GIBCO BRL). As células da suspensão foram diluídas em meio de lavagem na proporção 1:25, coradas com igual volume de azul de Tripán a 0,4% em PBS e as células viáveis foram contadas em câmara de Neubauer. Foi coletado o volume de suspensão correspondente a 5×10^6 células/mL e o restante do volume desejado foi ajustado com meio DMEM (Sigma-Aldrich), pH, 7,2, 10% SFB (LGC Biotecnologia). As suspensões foram distribuídas, em duplicata, em placa de fundo chato de 48 poços sem estímulo ou estimuladas com 5 μg de rPLHLc ou 25 μg de AgLc por poço. As placas foram incubadas em estufa a $37^{\circ}\text{C}/5\%$ de CO_2 e os sobrenadantes coletados em 24 e 72 h de incubação e armazenados a -20°C para posterior análise.

5.10 Obtenção de soro para detecção dos isotipos IgG1/IgG2a

No dia do sacrifício dos animais, foram coletados aproximadamente 300 μL de sangue de cada camundongo pela punção do saco retro orbital, tanto dos animais do teste de imunogenicidade, quanto dos animais do teste de desafio. Após coagulação espontânea em temperatura ambiente, o material foi centrifugado a $520 \times g/4^{\circ}\text{C}/10$ min para a obtenção do soro dos camundongos. Foi feito um *pool* de soro dos grupos de cada experimento para avaliação da produção dos anticorpos IgG1 e IgG2a.

5.11 Dosagem de citocinas

Foi feito o *pool* das amostras dos sobrenadantes de cada grupo/experimento das culturas de esplenócitos submetidos a estímulo com *AgLc* e coletados com 72 h de incubação, provenientes do teste de desafio. Foi utilizado o *kit BD Cytometric Bead Array(CBA)/ Mouse Th1/Th2/Th17 CBA* para dosagem das citocinas IFN- γ , TNF, IL-2, IL-17, IL-6, IL-10 e IL-4 por citometria de fluxo em BD FACSVerse do Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa – UFV.

5.12 Dosagem de NO

Os sobrenadantes das culturas de esplenócitos do teste de imunogenicidade e do teste de desafio foram analisados quanto à produção de nitrito pela reação de Griess, como medida da produção de NO (GREEN *et al.*, 1982). Resumidamente, em placa de fundo chato de 96 poços foi preparada uma curva padrão pela adição de 50 μ L de padrão de nitrito de sódio 250 μ M, em duplicata, a 50 μ L de DMEM (Sigma-Aldrich), pH 7,2, 10% SFB (LGC Biotecnologia), realizando-se, a partir daí, 12 diluições sucessivas 1:2 em poços contendo 50 μ L do mesmo meio. Foram adicionados em seguida, também em duplicata, 100 μ L de mistura 1:1 de soluções de sulfanilamida (1% em H₃PO₄ 2,5%) e dicloreto N-naftil etilenodiamina (0,1% em H₃PO₄ 2,5%) a 50 μ L de sobrenadante de cultura de esplenócitos (amostras), 50 μ L de DMEM (Sigma-Aldrich), pH 7,2, 10% SFB (LGC Biotecnologia), que foi nosso branco e aos poços dos padrões. Após 10 minutos de incubação na ausência de luz e em temperatura ambiente, foram feitas as leituras das amostras, branco e padrões sob luz com comprimento de onda de 570 nm em leitor Thermo Scientific- Multiskan™ GO.

5.13 Dosagem de IgG1 e IgG2a

Os isotipos IgG1 e IgG2a em soro dos camundongos foram dosados pela técnica de ELISA. Placas de fundo chato de 96 poços foram sensibilizadas com solução de rPLHLc em tampão carbonato pH 9,6 (1 μ g/poço) “overnight” a 4°C. Posteriormente, cada poço foi tratado para o bloqueio com solução de gelatina 2% por 30 minutos em

temperatura ambiente. O volume foi descartado e as placas foram lavadas 5 vezes com tampão PBS contendo 1% de Tween 20. Amostras dos soros diluídas 1:40 foram acrescentadas e a placa foi incubada durante 2 h em temperatura ambiente. Após 5 etapas de lavagem foram acrescentados os anticorpos secundários anti-IgG1 ou anti-IgG2a de camundongos produzidos em cabra, conjugados com peroxidase (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, Inc., Santa Cruz, CA, USA) por um período de incubação de 2 h em temperatura ambiente. Após nova etapa de lavagem, foi acrescentada solução reveladora orto-fenil diamina (OPD) em tampão citrato-fosfato 0,15 M, pH 5,0, acrescido de H₂O₂. A reação foi interrompida com o acréscimo de H₂SO₄ 1,5 M. A leitura foi realizada no leitor Thermo Scientific-Multiskan™ GO sob luz com comprimento de onda de 492 nm.

5.14 Análise estatística

Os dados foram submetidos á análise de variância (ANOVA) seguida de teste de comparação múltipla de Tukey ou teste de comparação múltipla de Bonferroni ou teste *t* de Student, dependendo do experimento, para calcular as diferenças entre os grupos. Para as análises, foi utilizado o programa GraphPad Prism 5 e valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

6. RESULTADOS

6.1 Quantificação da carga parasitária do baço e do fígado de camundongos BALB/c imunizados com rPLHLc

Com o objetivo de avaliar a proteção contra infecção por *L. infantum chagasi* induzida após imunização de camundongos BALB/c com rPLHLc, AIF + rPLHLc e SAP + rPLHLc e posteriormente desafiados com *L. infantum chagasi*, foi realizado ensaio da quantificação da carga parasitária no baço e no fígado dos animais. O resultado foi expresso como a média de - Log do título de parasitos/miligrama de tecido do órgão.

No baço foi observada redução da carga de parasitos por miligrama de tecido nos animais imunizados com SAP, rPLHLc, AIF + rPLHLc e SAP + rPLHLc, diminuindo respectivamente 32%, 50%, 40% e 61% o número de parasitos em comparação com o grupo controle PBS (Figura 5).

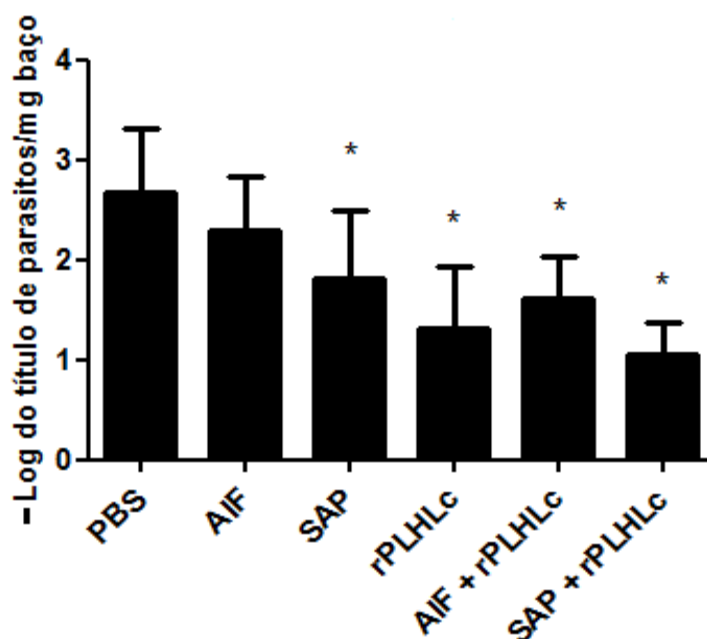


Figura 5: Quantificação da carga parasitária no baço. Quatro semanas após a infecção com formas promastigotas de *L. infantum chagasi*, camundongos BALB/c foram eutanasiados e 1/5 do baço foi extraído para a quantificação da carga parasitária pela técnica da diluição limitante. O resultado está expresso em - Log do título de parasitos por miligrama de tecido. As barras representam as médias + desvio padrão das médias dos dados combinados de dois experimentos independentes, totalizando até 8 camundongos por grupo. Diferenças entre a carga parasitária dos

grupos imunizados e a do grupo controle (PBS) foram determinadas pelo teste de comparação múltipla de Tukey (* $p < 0,05$).

No fígado foi observada redução da carga de parasitos por miligrama de tecido nos animais imunizados com rPLHLc, AIF + rPLHLc e SAP + rPLHLc, diminuindo respectivamente 49%, 50% e 81% o número de parasitos em comparação com o grupo controle PBS (Figura 6).

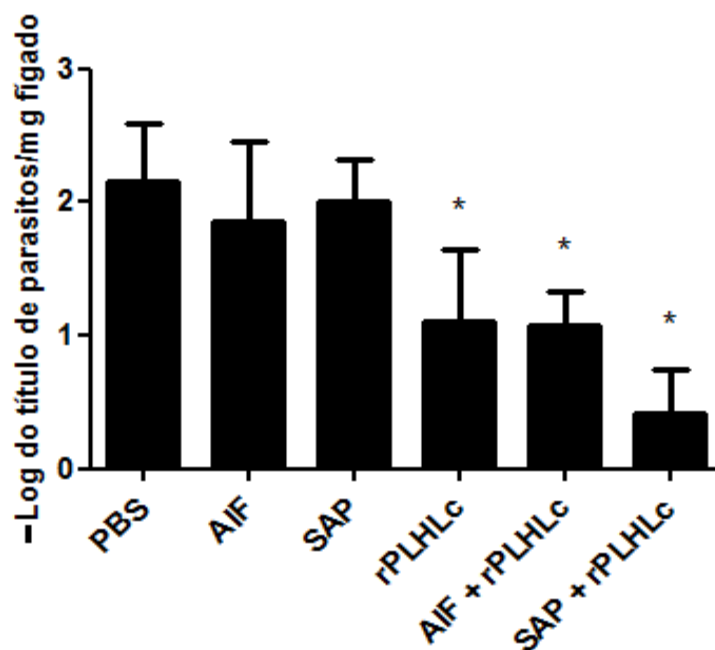


Figura 6: Quantificação da carga parasitária no fígado. Quatro semanas após a infecção com formas promastigotas de *L. infantum chagasi*, camundongos BALB/c foram eutanasiados e 50 a 100 mg do fígado foram extraídos para a quantificação da carga parasitária pela técnica da diluição limitante. O resultado está expresso em - Log do título de parasitos por miligrama de tecido. As barras representam as médias + desvio padrão das médias dos dados combinados de dois experimentos independentes, totalizando até 8 camundongos por grupo. Diferenças entre a carga parasitária dos grupos imunizados e a do grupo controle (PBS) foram determinadas pelo teste de comparação múltipla de Tukey (* $p < 0,05$).

6.2 Avaliação da produção de citocinas produzidas por culturas de esplenócitos estimuladas com AgLc após imunização de camundongos BALB/c com rPLHLc desafiado com *L. infantum chagasi*

Com o objetivo de avaliar a produção de citocinas relacionadas aos perfis de resposta Th1, Th17 e Th2 induzidas pela imunização com rPLHLc, foi realizada a dosagem de IFN- γ , TNF, IL-2, IL-17, IL-6, IL-10 e IL-4 em cada *pool* de amostras dos

sobrenadantes de cultura de esplenócitos submetidos a estímulo com *AgLc* de cada grupo do experimento do teste de desafio, com 72 h de incubação, conforme descrito na metodologia.

6.2.1 Produção de citocinas de perfil de resposta Th1

Em relação à produção de IFN- γ e IL-2, os esplenócitos dos grupos imunizados com AIF + rPLHLc e com SAP + rPLHLc estimulados com *AgLc* em média produziram essas citocinas em relação às suas respectivas culturas não estimuladas e aos esplenócitos estimulados do grupo controle PBS depois de 72 h de incubação. Em relação à produção de TNF, os esplenócitos do grupo imunizado com SAP + rPLHLc estimulado com *AgLc* em média produziram essa citocina em relação à sua respectiva cultura não estimulada e aos esplenócitos estimulados do grupo controle PBS depois de 72 h de incubação. Podemos observar que o grupo imunizado com AIF + rPLHLc estimulado com *AgLc* também em média produziu TNF em relação à sua respectiva cultura não estimulada, mas não em relação aos esplenócitos estimulados do grupo controle PBS, depois de 72 h de incubação (Figura 7).

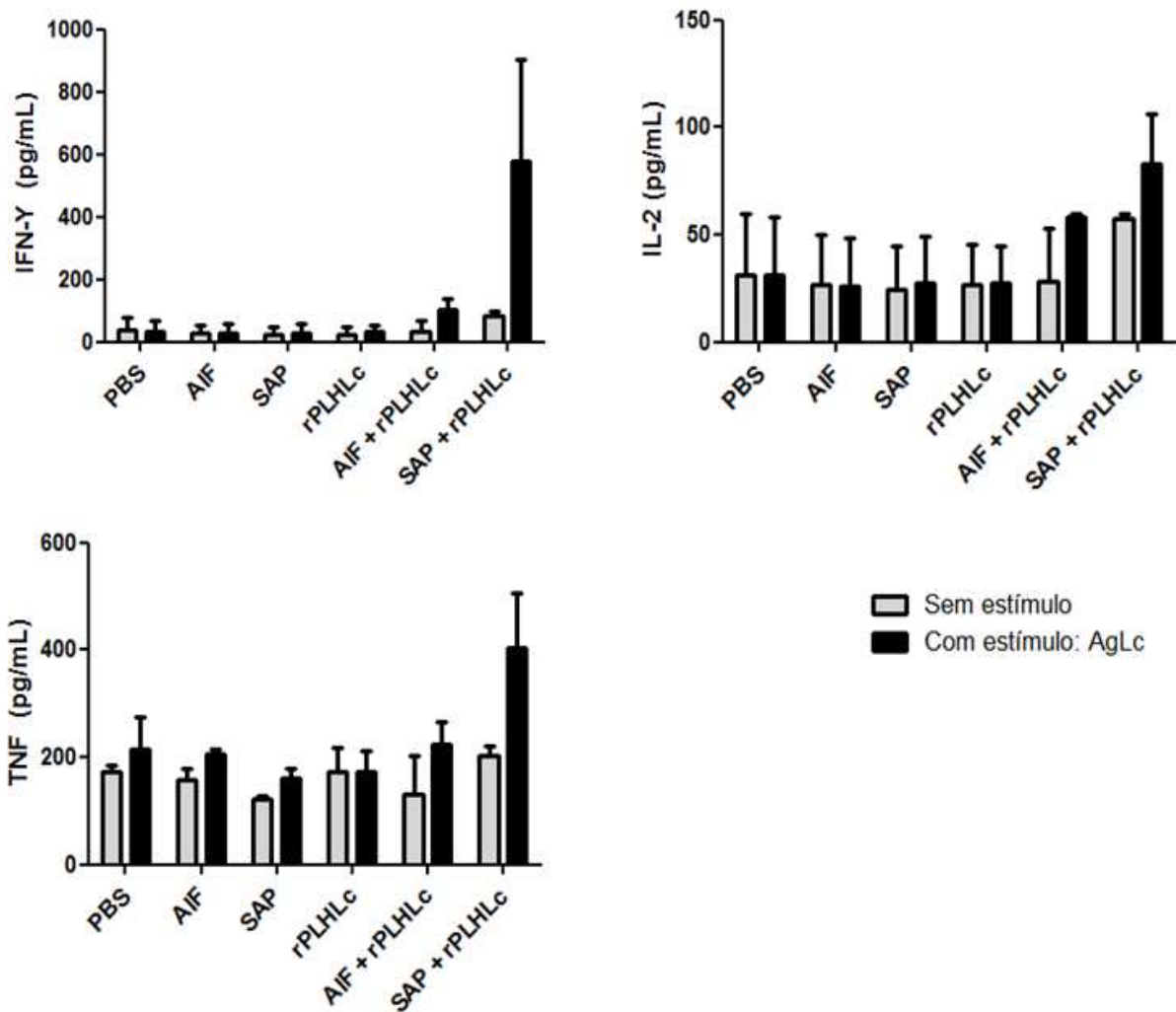


Figura 7: Produção de IFN- γ , IL-2 e TNF. Quatro semanas após a infecção com formas promastigotas de *L. infantum chagasi*, camundongos BALB/c previamente imunizados conforme descrito na metodologia foram eutanasiados e IFN- γ , IL-2 e TNF foram dosados por citometria de fluxo em sobrenadantes de cultura de esplenócitos incubados por 72 h a 37°C/5% CO₂, sob estímulo com AgLc ou não estimulados. As barras representam as médias + desvio padrão das médias dos dados combinados de dois experimentos independentes.

6.2.2 Produção de citocinas de perfil de resposta Th17

Em relação à produção de IL-17 e IL-6, os esplenócitos dos grupos imunizados com AIF + rPLHLc e com SAP + rPLHLc estimulados com AgLc em média produziram essas citocinas em relação às suas respectivas culturas não estimuladas e aos esplenócitos estimulados do grupo controle PBS depois de 72 h de incubação (Figura 8).

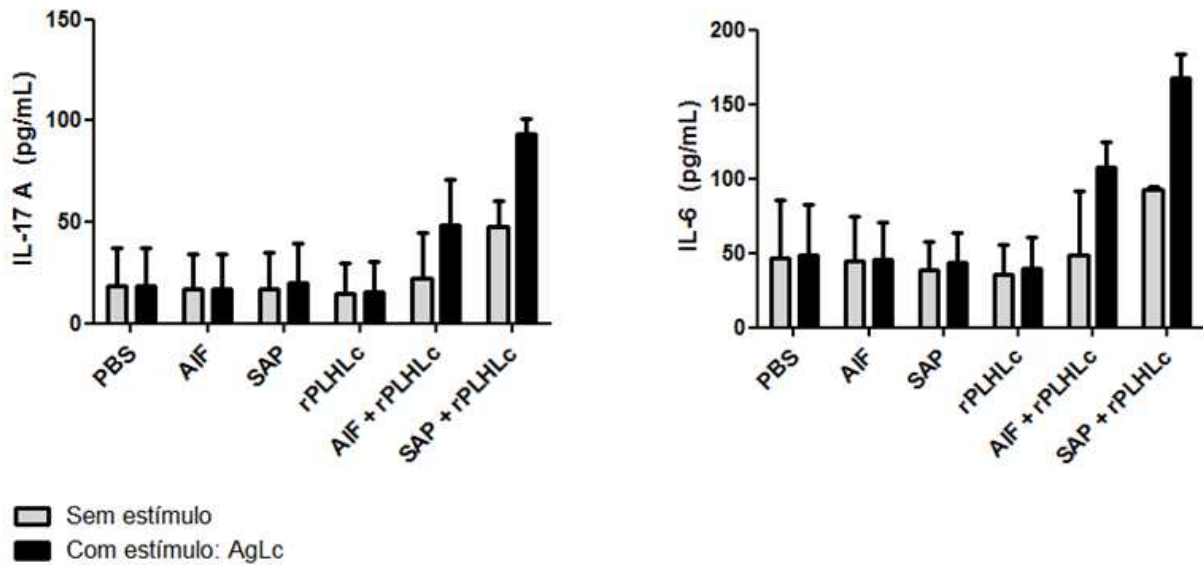


Figura 8: Produção de IL-17 e IL-6. Quatro semanas após a infecção com formas promastigotas de *L. infantum chagasi*, camundongos BALB/c previamente imunizados conforme descrito na metodologia foram eutanasiados e IL-17 e IL-6 foram dosados por citometria de fluxo em sobrenadantes de cultura de esplenócitos incubados por 72 h a 37°C/5% CO₂, sob estímulo com AgLc ou não estimulados. As barras representam as médias + desvio padrão das médias dos dados combinados de dois experimentos independentes.

6.2.3 Produção de citocina reguladora IL-10

Esplenócitos dos grupos imunizados com AIF + rPLHLc e com SAP + rPLHLc estimulados com AgLc em média produziram IL-10 em relação à suas respectivas culturas não estimuladas e aos esplenócitos estimulados do grupo controle PBS depois de 72h de incubação (Figura 9).

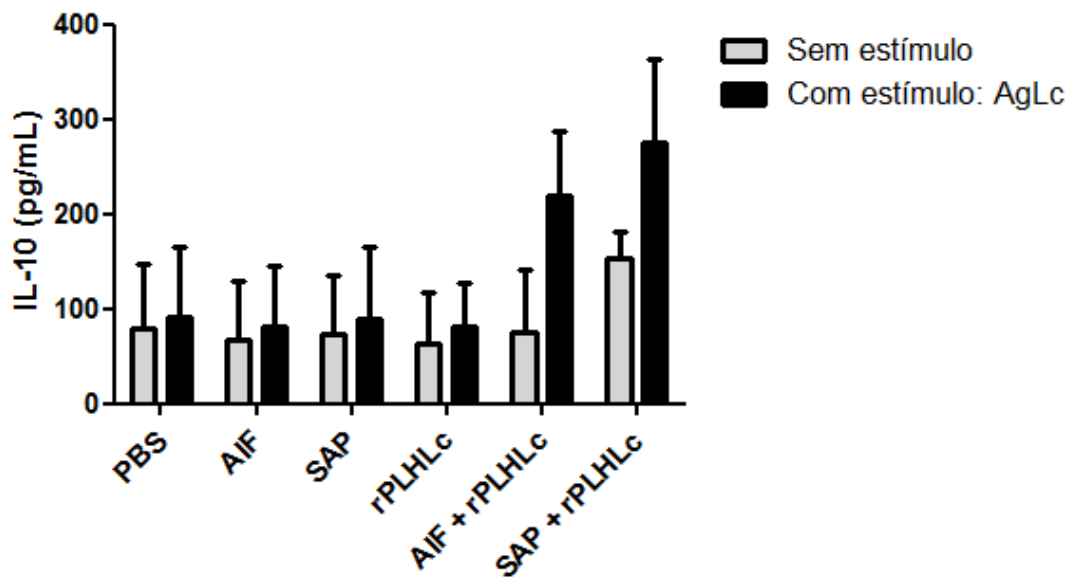


Figura 9: Produção de IL-10. Quatro semanas após a infecção com formas promastigotas de *L. infantum chagasi*, camundongos BALB/c previamente imunizados conforme descrito na metodologia foram eutanasiados e IL-10 foi dosado por citometria de fluxo em sobrenadantes de cultura de esplenócitos incubados por 72 h a 37°C/5% CO₂, sob estímulo com AgLc ou não estimulados. As barras representam as médias + desvio padrão das médias dos dados combinados de dois experimentos independentes.

6.2.4 Produção de citocina de perfil Th2

Não foi detectada produção de IL-4 por esplenócitos estimulados com AgLc e esplenócitos não estimulados dos seis grupos avaliados nos sobrenadantes coletados com 72 h de incubação (Figura 10).

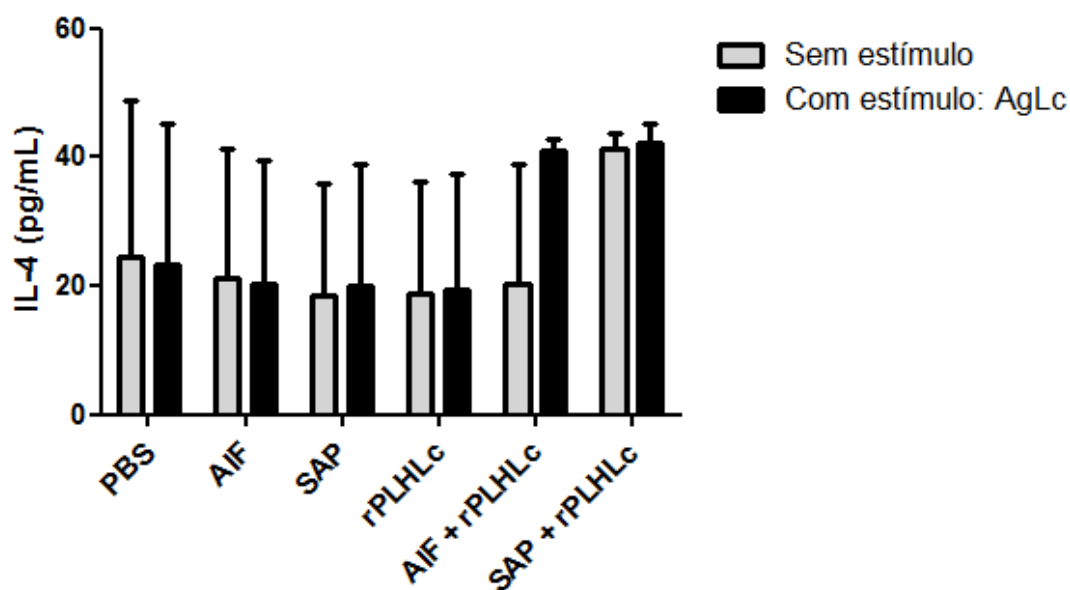


Figura 10: Produção de IL-4. Quatro semanas após a infecção com formas promastigotas de *L. infantum chagasi*, camundongos BALB/c previamente imunizados conforme descrito na metodologia foram eutanasiados e IL-4 foi dosado por citometria de fluxo em sobrenadantes de cultura de esplenócitos incubados por 72 h a 37°C/5% CO₂, sob estímulo com AgLc ou não estimulados. As barras representam as médias + desvio padrão das médias dos dados combinados de dois experimentos independentes.

6.3 Avaliação da produção de NO produzidas por cultura de esplenócitos estimulados com AgLc ou com rPLHLc após imunização de camundongos BALB/c com rPLHLc

Como o NO possui grande importância para a eliminação de parasitos intracelulares como a *Leishmania*, sua produção por células fagocitárias do baço foi avaliada indiretamente pela análise de nitrito em sobrenadante de cultura de esplenócitos dos camundongos dos 6 grupos experimentais (tanto dos experimentos onde os camundongos foram só imunizados – teste de imunogenicidade, quanto dos experimentos onde os camundongos foram imunizados e desafiados com *L. infantum chagasi* – teste de desafio), estimulados ou não com AgLc ou rPLHLc e coletado com 24 e 72 horas de incubação, conforme descrito na metodologia.

No entanto, no geral níveis insignificantes de NO foram detectados pelo método de Griess a partir dos sobrenadantes coletados. Foi possível distinguir alguma diferença na produção de NO apenas nos sobrenadantes incubados no tempo de 72h e que foram estimulados com rPLHLc. A figura 11-A mostra o experimento onde os grupos experimentais foram só imunizados para o teste de imunogenicidade. A figura 11-B

mostra o experimento onde os grupos experimentais foram imunizados e posteriormente desafiados com *L. infantum chagasi* para o teste de desafio. Observou-se que em ambos os casos apenas o grupo imunizado com SAP + rPLHLc mostrou em média produção de NO em relação as suas respectivas culturas sem estímulo e o grupo controle imunizado com PBS, porém não podemos afirmar que essa produção causou algum efeito biológico.

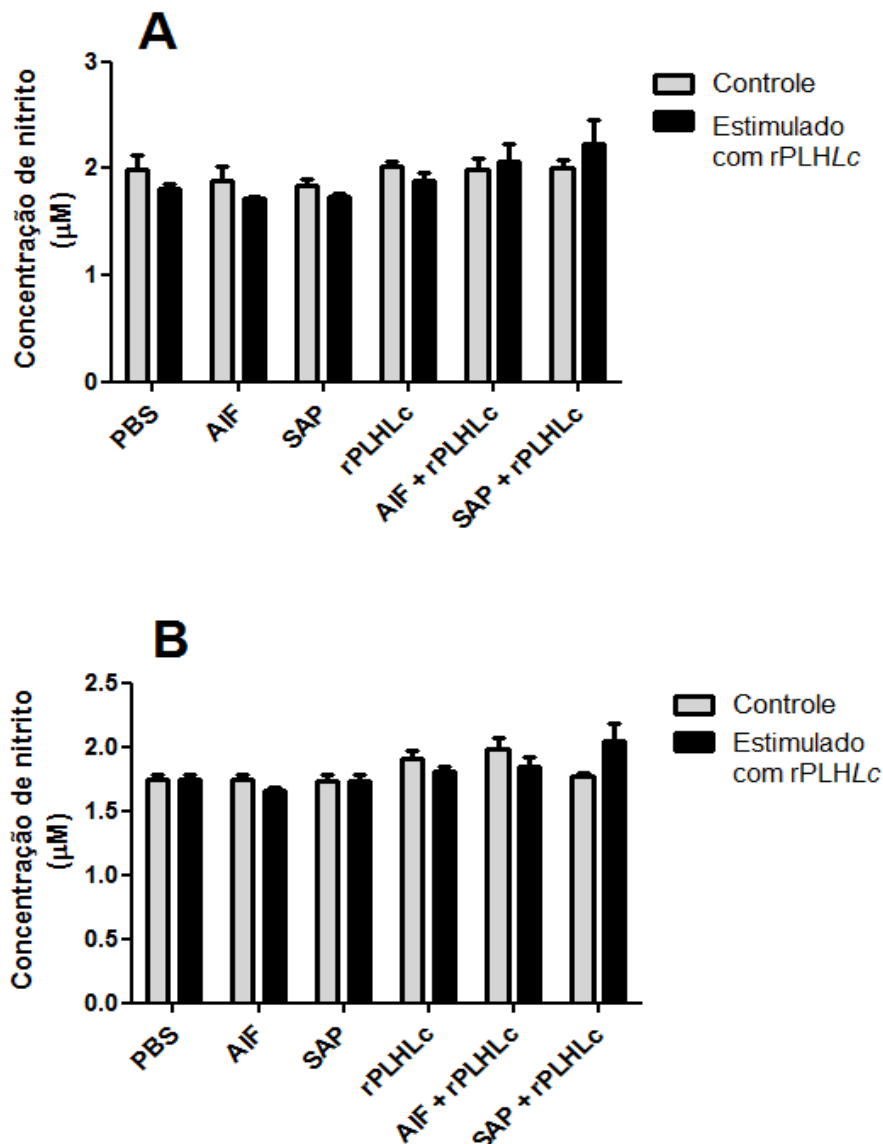


Figura 11: Produção de NO por esplenócitos murinos após imunização com rPLHLc associada ou não com adjuvante e desafiados ou não com *L. infantum chagasi*. (A) Duas semanas após o último reforço da imunização, camundongos BALB/c foram eutanasiados e nitrito foi dosado pelo método de Greiss, como indicativo da produção de NO, em sobrenadantes de cultura de esplenócitos incubados por 72h, submetidos aos estímulos com rPLHLc ou sem estímulo. (B) Quatro semanas após a infecção com formas promastigotas de *L. infantum chagasi*, camundongos BALB/c previamente imunizados conforme descrito na metodologia foram eutanasiados e NO foi dosado indiretamente pela análise de nitrito

utilizando o método de Griess em sobrenadantes de cultura de esplenócitos incubados por 72h, submetidos aos estímulos com rPLHLc ou sem estímulo. / Foram utilizados 4 camundongos por grupo e as barras representam as médias + desvio padrão das médias dos dados combinados de 2 experimentos independentes.

6.4 Dosagem dos isotipos IgG1 e IgG2a anti-rPLHLc

Para a avaliação da resposta humoral específica anti-rPLHLc e verificação do perfil de resposta Th1 e Th2, a produção dos isotipos IgG1 e IgG2a anti-rPLHLc foi mensurada nos soros dos camundongos provenientes de testes de imunogenicidade e de desafio.

6.4.1 IgG1

Em relação à produção desse isotipo de imunoglobulina, no teste de imunogenicidade os grupos que foram imunizados com rPLHLc, AIF + rPLHLc e SAP + rPLHLc mostraram em média aumento na produção de IgG1 anti-rPLHLc comparados ao grupo controle, imunizados com PBS. A imunização com AIF + rPLHLc mostrou em média um aumento maior na produção de IgG1 anti-rPLHLc quando comparados ao grupo imunizado com SAP + rPLHLc (Figura 12).

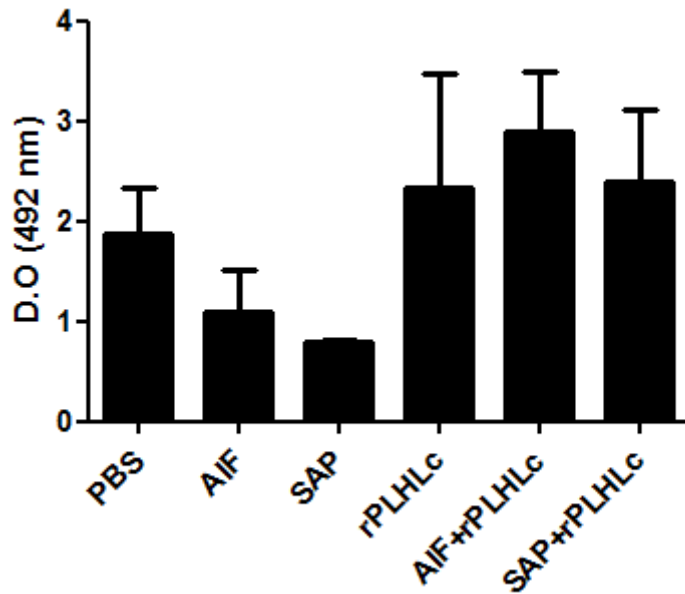


Figura 12: Produção de IgG1 anti-rPLHLc em murinos após a imunização com AIF, SAP, rPLHLc, AIF + rPLHLc e SAP + rPLHLc. Soros de camundongos BALB/c foram obtidos de sangue coletado, conforme descrito na metodologia. Os níveis de IgG1 anti-rPLHLc foram avaliados pela técnica de ELISA, onde a absorbância obtida é proporcional à concentração de anticorpos IgG1 na amostra analisada. As barras representam as médias + desvio padrão das médias dos dados combinados de dois experimentos independentes. Foi feito um *pool* de soro de 4 camundongos por grupo/experimento.

No teste de desafio, os grupos que foram imunizados com rPLHLc, AIF + rPLHLc e SAP + rPLHLc e posteriormente desafiados com *L. infantum chagasi*, mostraram em média aumento na produção de IgG1 anti-rPLHLc comparados ao grupo controle, imunizados com PBS e também desafiados com *L. infantum chagasi*. A imunização com AIF + rPLHLc mostrou em média um aumento maior na produção de IgG1 anti-rPLHLc quando comparados ao grupo imunizado com SAP + rPLHLc (Figura 13).

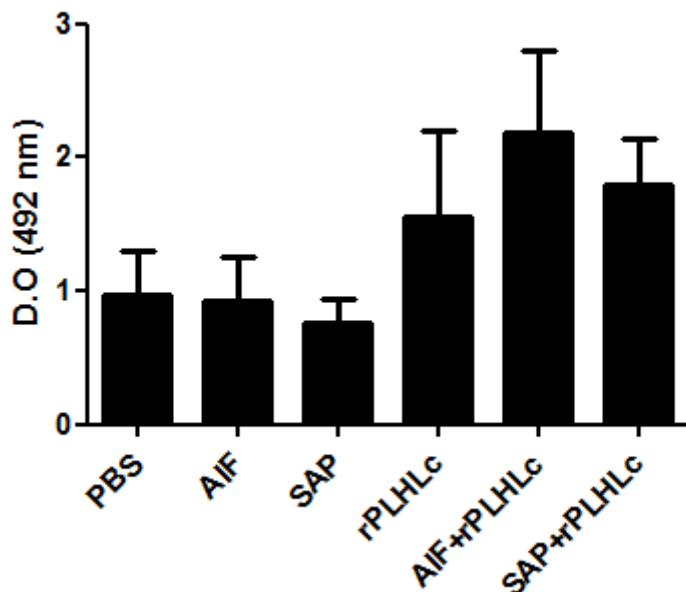


Figura 13: Produção de IgG1 anti-rPLHLc em murinos após a imunização com AIF, SAP, rPLHLc, AIF + rPLHLc e SAP + rPLHLc e posterior desafio com *L. infantum chagasi*. Soros de camundongos BALB/c foram obtidos de sangue coletado, conforme descrito na metodologia. Os níveis de IgG1 anti-rPLHLc foram avaliados pela técnica de ELISA, onde a absorbância obtida é proporcional à concentração de anticorpos IgG1 na amostra analisada. As barras representam as médias + desvio padrão das médias dos dados combinados de dois experimentos independentes. Foi feito um *pool* de soro de 4 camundongos por grupo/experimento.

6.4.2 IgG2a

Em relação à produção de IgG2a anti-rPLHLc, os grupos que foram imunizados com rPLHLc, AIF + rPLHLc e SAP + rPLHLc, mostraram em média aumento na produção de IgG2a anti-rPLHLc comparados ao grupo controle, imunizados com PBS (Figura 14).

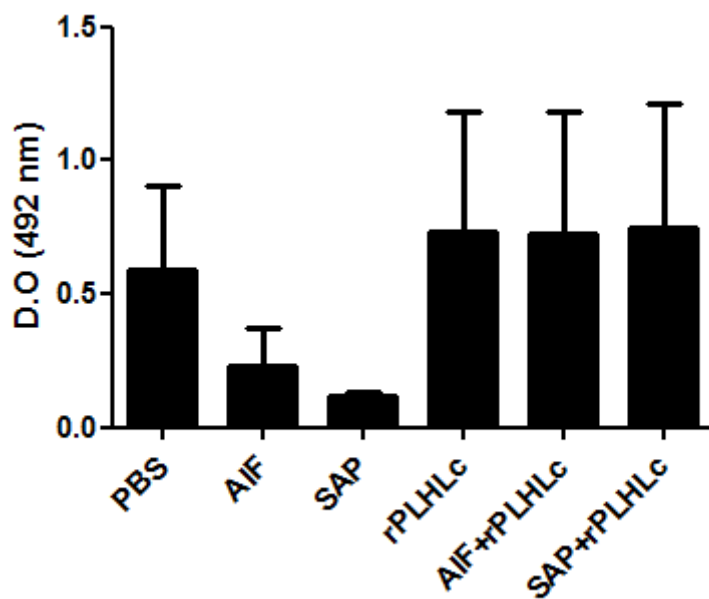


Figura 14: Produção de IgG2a anti-rPLHLc em murinos após a imunização com AIF, SAP, rPLHLc, AIF + rPLHLc e SAP + rPLHLc. Soros de camundongos BALB/c foram obtidos de sangue coletado, conforme descrito na metodologia. Os níveis de IgG2a anti-rPLHLc foram avaliados pela técnica de ELISA, onde a absorbância obtida é proporcional à concentração de anticorpos IgG2a na amostra analisada. As barras representam as médias + desvio padrão das médias dos dados combinados de dois experimentos independentes. Foi feito um *pool* de soro de 4 camundongos por grupo/experimento.

Os grupos que foram imunizados com rPLHLc, AIF + rPLHLc e SAP + rPLHLc e posteriormente desafiados com *L. infantum chagasi* no teste de desafio, mostraram também em média aumento na produção de IgG2a anti-rPLHLc comparados ao grupo controle, imunizados com PBS e também desafiados com *L. infantum chagasi*. A imunização com SAP + rPLHLc mostrou em média um aumento maior na produção de IgG2a anti-rPLHLc quando comparados ao grupo imunizado com AIF + rPLHLc (Figura 15).

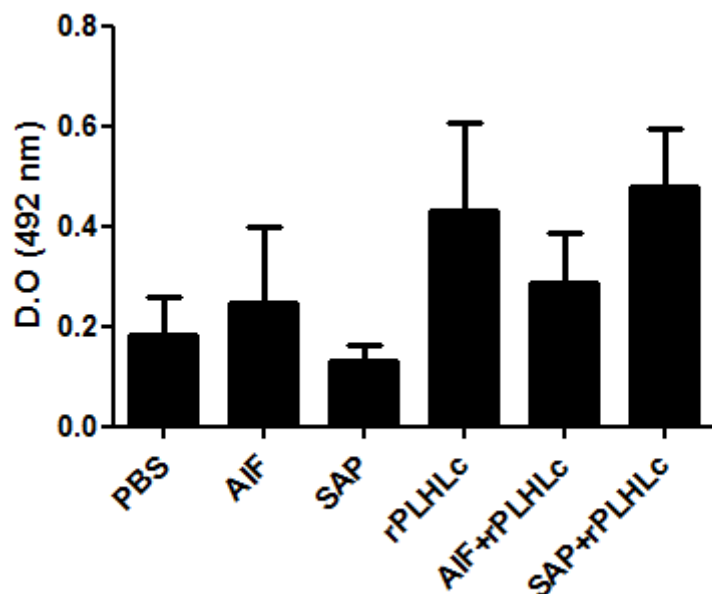


Figura 15: Produção de IgG2a anti-rPLHLc em murinos após a imunização com AIF, SAP, rPLHLc, AIF + rPLHLc e SAP + rPLHLc e posterior desafio com *L. infantum chagasi*. Soros de camundongos BALB/c foram obtidos de sangue coletado, conforme descrito na metodologia. Os níveis de IgG2a anti-rPLHLc foram avaliados pela técnica de ELISA, onde a absorbância obtida é proporcional à concentração de anticorpos IgG2a na amostra analisada. As barras representam as médias + desvio padrão das médias dos dados combinados de dois experimentos independentes. Foi feito um *pool* de soro de 4 camundongos por grupo/experimento.

6.4.3 Razão IgG1/IgG2a

A relação IgG1 e IgG2a foi analisada para estimar o direcionamento de resposta imunológica de cada grupo experimental. Valores acima ou abaixo dos encontrados no grupo controle demonstram direcionamento para resposta Th2 ou Th1, respectivamente.

Como observado na figura 16, no teste de imunogenicidade, o grupo imunizado com AIF + rPLHLc em média direcionou a resposta para Th2, quando comparado com o controle imunizado com PBS. Os grupos imunizados com rPLHLc e SAP + rPLHLc em média direcionaram para um padrão de resposta mista Th1/Th2, pois a figura mostra uma razão IgG1/IgG2a desses grupos semelhante à razão IgG1/IgG2a do grupo controle imunizado com PBS.

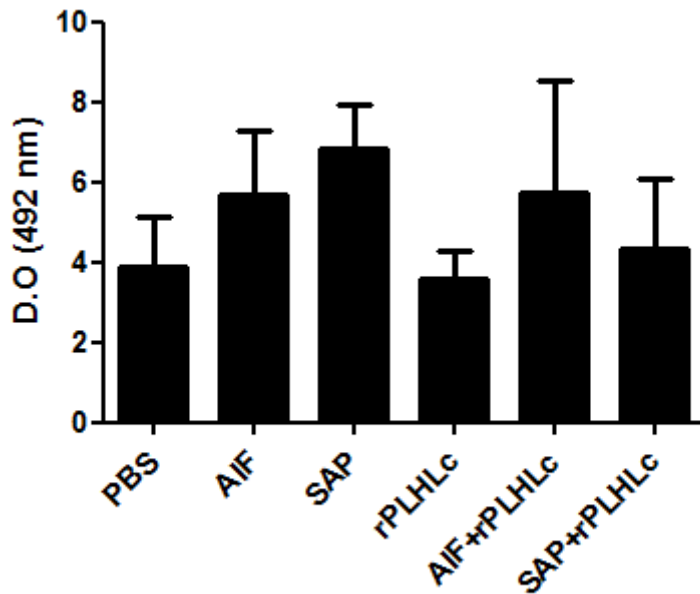


Figura 16: Razão entre a produção de IgG1/IgG2a por camundongos imunizados com AIF, SAP, rPLHLc, AIF + rPLHLc e SAP + rPLHLc. A produção de IgG1 e IgG2a anti-rPLHLc foi dosado em soro diluído 1:40 pela técnica de ELISA. Foi realizado a razão entre a produção de IgG1/IgG2a. As barras representam as médias + desvio padrão das médias dos dados combinados de 2 experimentos independentes.

A figura 17 mostra o perfil de resposta auxiliar inferido pela razão IgG1/IgG2a para os grupos do teste de desafio.

O grupo imunizado com AIF + rPLHLc e posteriormente desafiado com *L. infantum chagasi* mostra em média direcionamento para resposta para Th2, quando comparado com o controle imunizado com PBS e posteriormente desafiado. Os grupos imunizados com rPLHLc e SAP + rPLHLc em média direcionaram para um perfil de resposta Th1 quando comparados com seus respectivos controles imunizados com PBS e posteriormente desafiado com *L. infantum chagasi*.

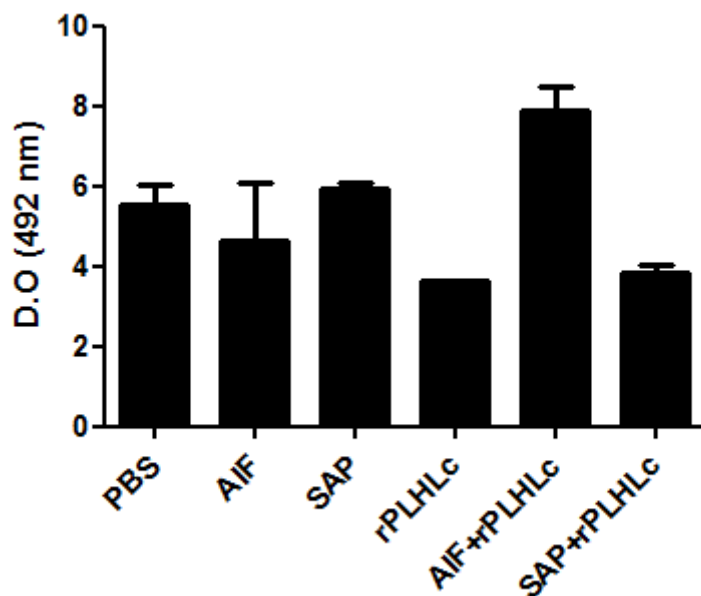


Figura 17: Razão entre a produção de IgG1/IgG2a por camundongos imunizados com AIF, SAP, rPLHLc, AIF + rPLHLc e SAP + rPLHLc e posteriormente desafiados com *L. infantum chagasi*. A produção de IgG1 e IgG2a anti-rPLHLc foi dosado em soro diluído 1:40 pela técnica de ELISA. Foi realizado a razão entre a produção de IgG1/IgG2a. As barras representam as médias + desvio padrão das médias dos dados combinados de 2 experimentos independentes.

7. DISCUSSÃO

Alguns autores já estudaram PLH de algumas espécies de *Leishmania* no que diz respeito à participação dessa lectina em processos de adesão à célula hospedeira (MARTINS *et al.*, 2015; DE CASTRO CORTES *et al.*, 2012a; DE CASTRO CORTES *et al.*, 2012b; AZEVEDO-PEREIRA *et al.*, 2007; SVOBODOVA *et al.*, 1997; SMITH; RANGARAJAN, 1995; LOVE *et al.*, 1993). Experimentos realizados recentemente em nosso laboratório, em paralelo com o trabalho atual, que investigam a caracterização da estrutura da rPLHLc, mostraram que o gene codificante da proteína em estudo é que codifica o lipofosfoglicano 3 (LPG3), ou seja, a rPLHLc é uma LPG3 e uma de suas funções, até o momento desconhecida, é a de se ligar a heparina. LPG3 está envolvido em diversos processos, como: apresentação de antígenos, dobradura e montagem de proteínas, além de conter propriedades antigênicas e imunogênicas similares a de outros antígenos conservados de *Leishmania* (LARRETA *et al.*, 2000; LARRETA *et al.*, 2002). Um grupo de pesquisa vem trabalhando com a LPG3 de *Leishmania infantum* e em um de seus trabalhos foi feita a clonagem e a expressão do gene LPG3 de *L. infantum* em um sistema de expressão em *Leishmania* Lizard (PIRDEL *et al.*, 2012). Posteriormente, foi testada uma vacina de DNA com o gene codificante de LPG3, que se mostrou imunogênica, mas não protetora contra a LV em camundongos (PIRDEL *et al.*, 2014). Finalmente, com o objetivo de se obter proteção, o protocolo de imunização foi modificado pelos pesquisadores, que utilizaram *Leishmania tarentolae* como vetor para o gene de LPG3, alcançando proteção parcial contra a LV também em camundongos (PIRDEL; FARAJNIA, 2017). Apesar dos resultados terem mostrado resposta protetora, utilizar como antígeno o parasito vivo é um fator de risco e o diferencial do nosso trabalho é demonstrar que há proteção significativa utilizando a proteína recombinante do parasito como vacina de segunda geração, assim como já vem sendo demonstrado em muitos trabalhos da literatura, como os que estão revisados em JAIN (2015). No entanto, em adição às últimas descobertas sobre a estrutura da rPLHLc obtidas por nosso grupo de pesquisa (dados em publicação), o objetivo principal desse trabalho foi dar continuidade aos resultados de outros experimentos feitos anteriormente em nosso laboratório, ou seja, mostrar que a forma recombinante da PLHLc também confere imunogenicidade e proteção contra *L. infantum chagasi* em camundongos

BALB/c assim como foi mostrado utilizando como antígeno vacinal a PLHLc em sua forma nativa (dados não publicados).

Em relação ao padrão esplênico de produção de citocinas no teste de desafio, os animais que foram imunizados apenas com rPLHLc, mesmo com a estimulação das culturas com AgLc, não produziram níveis de citocinas maiores comparados ao grupo controle PBS, apesar desse grupo imunizado com a proteína ter mostrado diminuir a carga parasitária em 50% no baço e 49% no fígado desses animais, em relação ao grupo controle imunizado com PBS. Os animais que foram imunizados com a rPLHLc administrada junto com o adjuvante AIF cujos esplenócitos foram estimuladas com AgLc, mostraram em média aumento na produção das citocinas IFN- γ , TNF, IL-2, IL-17, IL-6 e IL-10 se comparados com os animais cujos esplenócitos não foram estimulados e ao grupo controle PBS. Portanto, esse grupo denominado AIF + rPLHLc mostrou diminuir a carga parasitária em 40% no baço e 50% no fígado desses animais, em relação ao grupo controle imunizado com PBS. Quando os animais foram imunizados com a rPLHLc juntamente com o adjuvante SAP e suas culturas foram estimuladas com AgLc, os níveis de produção das citocinas IFN- γ , TNF, IL-2, IL-17, IL-6 e IL-10 também aumentaram em média comparado às suas respectivas culturas não estimuladas e ao grupo controle PBS. Além disso, os níveis de produção dessas citocinas, no geral, foram em média maiores do que os níveis produzidos pelo grupo AIF + rPLHLc e conseqüentemente esse grupo conseguiu em média diminuir ainda mais a carga parasitária, 61% no baço e 81% no fígado dos animais, em relação ao grupo controle imunizado com PBS.

As citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , TNF e IL-2 são produzidas por células Th1 ativadas e são importantes na ativação das vias microbidas dos macrófagos (FALEIRO *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2016b). IFN- γ é uma das mais importantes para o controle da proliferação de *Leishmania* (KIMA; SOONG, 2013), pois leva à produção de NO por macrófagos, resultando no controle da proliferação do parasito devido a suas ações microbidas (DING *et al.*, 1988). A vacina licenciada contra LVC na Europa, a *Canileish* (LiESP/QA-21), desenvolve proteção por estimular uma resposta imunológica mediada por células Th1, especialmente com a produção de IFN- γ (MORENO *et al.*, 2012). Durante a fase de triagem clínica para avaliar a imunogenicidade da vacina *Leish-F1+MPL-SE*, houve produção das citocinas IFN- γ e IL-10 e não houve produção de IL-4. A proteção da vacina nesse estudo foi associada

principalmente aos altos níveis de IFN- γ produzidos (CHAKRAVARTY *et al.*, 2011). Em um estudo da expressão de seis citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10) marcadoras de resposta de células T de memória sob estímulo de SLA em humanos, a única citocina produzida associada aos pacientes curados ou resistentes a LV foi a IFN- γ (KUMAR *et al.*, 2010).

A citocina TNF além de estar envolvida na ativação de macrófagos, também tem importância na participação da formação e manutenção dos granulomas inflamatórios hepáticos responsáveis pelo controle da infecção no fígado (MURRAY *et al.*, 2000). A maioria dos patógenos induz um aumento acelerado na produção de TNF na tentativa do organismo em controlar a infecção (MUELLER *et al.*, 2009). Em um estudo utilizando camundongos infectados por *Leishmania major*, a presença de anticorpos anti-TNF relacionou-se a uma importante diminuição da ação leishmanicida de macrófagos, assim como ao desenvolvimento de lesões cutâneas maiores (LIEW *et al.*, 1990). A IL-2 é parte da resposta natural do organismo a infecções microbianas e fatores externos. Atua na maturação de linfócitos B e de células T, além de regular as atividades das células brancas do sangue que são responsáveis pela imunidade (LIAO; JIAN-XIN, 2011). Estudos demonstram que a susceptibilidade à LVC está correlacionada com ausência da resposta linfoproliferativa e ausência da produção de citocinas como IFN- γ e IL-2 (PINELLI *et al.*, 1994a; PINELLI *et al.*, 1994b; RHALEM *et al.*, 1999a; RHALEM *et al.*, 1999b). Outro estudo que teve como objetivo estabelecer um método simples para detectar pessoas assintomáticas infectadas por *L. infantum* em áreas endêmicas demonstrou que usando a mensuração de produção de IL-2 foi possível detectar todos os indivíduos assintomáticos com respostas imunes celulares específicas de *Leishmania* (IBARRA-MENESES *et al.*, 2016). Resultados semelhantes foram descritos em estudos que avaliaram áreas endêmicas pela infecção por *Leishmania donovani* (GIDWANI *et al.*, 2011; SINGH; GIDWANI *et al.*, 2012; SINGH; STOBER *et al.*, 2012). Além do perfil de resposta Th1, Th17 também está relacionada com resolução da LV (DE FREITAS *et al.*, 2016). Durante a infecção no baço, as CDs secretam citocinas como a IL-6 e IL-23 que promovem a diferenciação de células Th0 em células T CD4⁺ efectoras com padrão Th17 e estas células produzem a IL-17, que contribui com a migração, recrutamento e ativação de neutrófilos para o local da infecção (RODRIGUES *et al.*, 2016b; BHATTACHARYA; ALI, 2013). Um estudo mostrou exacerbação das lesões na pele de camundongos que foram infectados com *L. major* e são deficientes de IL-17, o

que sugere a importância da IL-17 produzida por células Th17 na patogênese da LC (LOPEZ KOSTKA *et al.*, 2009).

Na Leishmaniose Visceral Humana (LVH), IL-17 e IL-22 estão associadas à proteção contra a reexposição ao parasito, o que sugere a participação da IL-17 na imunidade protetora induzida por vacina (BANERJEE *et al.*, 2016). Foi mostrado também que IL-17 e IL-22 levam à proteção contra LV causada por *L. donovani*, sugerindo que estas citocinas atuam complementando o papel protetor das citocinas Th1 de modo não dependente (PITTA *et al.*, 2009). Outra citocina importante é a IL-10, que tem função reguladora e em níveis elevados promove a supressão da resposta imune de padrão Th1, induzindo a persistência do parasito e a cronificação da doença (DE FREITAS *et al.*, 2016). O estudo da expressão de IL-10 em humanos levou à conclusão de que a ativação de macrófagos mediada por IFN- γ é bloqueada por essa citocina. Esse dado foi corroborado pela demonstração da supressão da resposta específica de células T contra *L. donovani* (GHALIB *et al.*, 1993). Altos níveis de IL-10 produzidos por macrófagos ativados do tipo II também inibiram as células vizinhas de responderem à ativação por IFN- γ e produzirem espécies reativas de nitrogênio em camundongos (MOSSER, 2003). No entanto, outros trabalhos mostram que a IL-10 desempenha importante papel na homeostase das respostas imunes, proporcionando o estado de equilíbrio do sistema imune após a resolução de uma infecção e que o aumento dos níveis de IL-10 pode ser uma resposta aos níveis de IFN- γ produzidos em modelos murinos para evitar possíveis danos ao hospedeiro (GHALIB *et al.*, 1993), e que o efeito regulador da IL-10 pode estar associado ao sucesso de uma vacina (STOBER *et al.*, 2005). Todos esses dados ajudam a reforçar que os resultados encontrados nesse trabalho são positivos e que nossos objetivos foram alcançados no que diz respeito a demonstrar que a rPLHLc, quando administrada com adjuvantes, foi eficaz contra a LV, uma vez que o grupo de animais imunizados com AIF + rPLHLc ou com SAP + rPLHLc foram capazes de produzir proteção contra a *L. infantum chagasi* por intermédio da indução de padrão de resposta imune Th1, de acordo com a produção das citocinas IFN- γ , TNF e IL-2 e por indução de padrão de resposta imune Th17, de acordo com a produção das citocinas IL-17 e IL-6, além da produção da citocina IL-10, que, como dito anteriormente, é associada ao sucesso de uma vacina.

Os estudos feitos anteriormente em nosso laboratório utilizando a PLHLc em sua forma nativa na imunização dos camundongos experimentais também produziram

padrões de resposta imune semelhante de acordo com a produção dessas mesmas citocinas (dados não publicados). Além disso, esse experimento relacionado ao padrão esplênico de produção de citocinas no teste de proteção serviu para demonstrar a eficácia do uso da rPLHLc em nosso trabalho, uma vez que as células mononucleares isoladas do baço dos camundongos imunizados com rPLHLc foram capazes de ser reestimuladas quando incubadas com antígeno particulado de *L. infantum chagasi* (AgLc), ou seja, com um *mix* de proteínas nativas extraídas direto de culturas axênicas de *L. infantum chagasi* mantida em laboratório.

A IL-4 é a principal citocina do subgrupo Th2, sendo responsável pela diferenciação e ativação dos linfócitos Th0 em linfócitos Th2 e, sendo assim, responsável pelo direcionamento da resposta imune para uma resposta humoral, considerada inicialmente como um marcador da LV (BHATTACHARYA;ALI, 2013; FALEIRO *et al.*, 2014). Além disso, a IL-4 também age como supressora da resposta Th1, pois está relacionada com o impedimento da expansão e migração dos neutrófilos para os locais de infecção e inflamação por antagonizar o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) e os sinais mediados por receptores de quimiocinas (NELMS *et al.*, 1999; HASBOLD *et al.*, 1999; WOYTSCHAK *et al.*, 2016). Nas três formulações vacinais avaliadas em nosso trabalho (rPLHLc, AIF + rPLHLc e SAP + rPLHLc) não houve produção de IL-4 pelos esplenócitos estimulados, assim como aconteceu no teste de proteção anteriormente feito em nosso laboratório onde utilizamos como imunógeno a PLHLc na forma nativa (dados não publicados). Esses resultados reforçam ainda mais o sucesso a nossa busca por proteção contra a LV com a formulação vacinal utilizada em nosso trabalho.

A produção de NO por macrófagos é induzida principalmente por IFN- γ , que juntamente com o TNF- α produzido pelos próprios macrófagos e pelo TNF- β produzido por linfócitos T, promove a transcrição da enzima iNOS resultando no controle da proliferação das formas amastigotas intracelulares do parasito (DING *et al.*, 1988). Foi demonstrado, por imunoistoquímica, que cães infectados com *L. infantum* com carga parasitária cutânea menor tinham maior produção de NO se comparados com cães infectados que tinham carga parasitária cutânea maior (AMORIM *et al.*, 2011). A produção de NO também foi mostrada pela ativação de células 030-D (uma linhagem celular de macrófagos caninos), por incubação com um sobrenadante derivado de

linhagem de células T específicas para *Leishmania*. Além disso, foi observado o aumento da atividade leishmanicida nestas células após a ativação. Portanto, a produção de NO por macrófagos está correlacionada com a indução de atividade protetora contra *Leishmania* (VOULDOUKIS *et al.*, 1995; PINELLI *et al.*, 2000). Para avaliar o potencial microbicida de macrófagos ativados nos diferentes grupos imunizados, a produção de NO foi avaliada por intermédio dos níveis de nitrito presente no sobrenadante de culturas de esplenócitos de camundongos imunizados com a rPLHLc, AIF + rPLHLc e SAP + rPLHLc após estimulação com AgLc ou com a própria rPLHLc, com 24h ou 72h de incubação, tanto no teste de imunogenicidade quanto no teste de desafio. Nossos resultados só mostraram produção de NO nas culturas estimuladas com rPLHLc e incubadas por 72h. Tanto no teste de imunogenicidade quanto no teste de desafio, o único grupo estimulado que em média produziu NO, mesmo que pouco, comparado à sua respectiva cultura não estimulada e à cultura do grupo controle PBS foi o imunizado com SAP + rPLHLc, porém não podemos afirmar que essa produção levou à alguma variação biológica, mas, tais resultados corroboram com a ideia de que o grupo imunizado com SAP + rPLHLc foi o que mais protegeu contra a infecção, uma vez que esse grupo também foi o que em média mais diminuiu a carga parasitária nos órgãos infectados examinados e foi o que mais em média produziu IFN- γ comparado aos demais grupos. Altos níveis de IFN- γ /NO estão diretamente relacionados com o controle da proliferação do parasito (PANARO *et al.*, 2001). Trabalhos mostraram que a produção de IFN- γ /NO são necessários para eliminar os parasitos que pertencem ao complexo *Leishmania donovani* (SOONG *et al.*, 2012), sendo esses parasitos mais resistentes à ação microbicida do NO quando comparado aos de outros complexos. Cães que foram imunizados com uma vacina produzida a partir de proteínas de *L. braziliensis* mais SAP e posteriormente desafiados com *L. infantum chagasi*, apresentaram altos níveis de IFN- γ e NO e foram protegidos contra a infecção (RESENDE *et al.*, 2013). Em teste de imunogenicidade realizado anteriormente em nosso laboratório, utilizando como antígeno a forma nativa da PLHLc nos mostrou também que os grupos avaliados imunizados que tiveram produção de IFN- γ e NO apresentaram uma resposta positiva no controle do parasitismo por *Leishmania* (dados não publicados). Mas no geral, os níveis de NO não foram mensurados significativamente em nosso trabalho. Isso pode indicar que o método utilizado por nós, que foi a reação de Griess como medida da produção de óxido nítrico, não foi sensível o suficiente para o tratamento de nossas amostras.

Os isotipos de imunoglobulinas IgG1 e IgG2a são bastante utilizados como marcadores de resposta Th1 ou Th2 em camundongos (COFFMAN *et al.*, 1993; HASBOLD *et al.*, 1999). Estudo da avaliação do curso da infecção e da resposta imunológica desenvolvida por camundongos BALB/c infectados por *L. infantum* mostraram picos de produção de IgG1 e IgG2a, coincidentes com picos de carga parasitária no baço e no fígado e a cinética de ambos os isotipos estava fortemente relacionada entre si, levando em consideração que IgG1 e IgG2a estão associadas com o desenvolvimento da resposta imune Th2 e Th1, respectivamente (LIEW; O'DONNELL, 1993). Em estudo com camundongos imunizados com antígenos lipossomais e infectados com *L. donovani*, níveis significativamente superiores de IgG1 em relação a IgG2a, IgG2b e IgG3 foram observados, sugerindo uma resposta Th2 dominante, resultando em fraca proteção contra a LV (AFRIN *et al.*, 2000). Estudo de dois novos antígenos de *L. major* em camundongos resistentes e suscetíveis à infecção mostrou a produção de resposta dominante de IgG2a, nos dois modelos, importante na cura da LC (MOHAMMADI *et al.*, 2006). Nesse trabalho, para a avaliação da resposta humoral específica anti-rPLHLc e verificação do perfil de resposta Th1 e Th2, a produção dos isotipos IgG1 e IgG2a anti-rPLHLc foi mensurada pela técnica de ELISA no soro de camundongos controle, no soro de camundongos só imunizados com AIF, SAP, rPLHLc, AIF + rPLHLc e SAP + rPLHLc (teste de imunogenicidade) e no soro de camundongos imunizados com PBS, AIF, SAP, rPLHLc, AIF + rPLHLc e SAP + rPLHLc e posteriormente desafiados com *L. infantum chagasi* (teste de desafio). A relação IgG1 e IgG2a, portanto, foi analisada para estimar qual o direcionamento de resposta imunológica de cada grupo experimental. Valores acima ou abaixo dos encontrados no grupo controle demonstram direcionamento para resposta Th2 ou Th1, respectivamente. Tanto para o teste de imunogenicidade quanto para o teste de desafio, o grupo imunizado com AIF + rPLHLc direcionou a resposta mais para Th2, quando comparado a grupo imunizado com SAP + rPLHLc. No teste de imunogenicidade, os grupos imunizados com rPLHLc e SAP + rPLHLc direcionaram para um padrão de resposta mista Th1/Th2, pois a razão IgG1/IgG2a desses grupos é semelhante à razão IgG1/IgG2a do grupo controle imunizado com PBS. Já no teste de proteção, os grupos imunizados com rPLHLc e SAP + rPLHLc direcionaram para um padrão de resposta Th1. Podemos comparar esses resultados com o trabalho anteriormente feito em nosso laboratório, que também obteve direcionamento da resposta imune para um padrão misto Th1/Th2 no grupo em que os camundongos BALB/c foram imunizados com a

PLHLc na sua forma nativa (dados não publicados). Na literatura são encontrados tanto trabalhos que relacionam a proteção contra a LV com uma resposta Th1 quanto trabalhos que relacionam essa proteção com o perfil misto Th1/Th2 (FERNANDES *et al.*, 2014b; VITORIANO-SOUZA *et al.*, 2012). Um estudo que comparou o perfil de citocinas e NO produzidas por duas vacinas utilizadas contra a LVC, Leishmune[®] e Leishvacin[®], em experimentos de imunização de cães, identificou dois perfis distintos produzidos por cada vacina. A Leishmune[®] induziu um perfil Th1 mostrando aumento dos níveis de IFN- γ e NO, enquanto a Leishvacin[®] induziu um padrão misto Th1/Th2, com produção de IFN- γ e IL-4, corroborando resultados de trabalhos prévios que demonstraram que os níveis de IgG2a são dependentes de IFN- γ e os níveis de IgG1 são correlacionados com a IL-4. Porém, as vacinas foram capazes de ativar fagócitos e células T CD8⁺ que são importantes na eliminação de parasitos intracelulares como a *Leishmania* (ARAUJO *et al.*, 2009; COFFMAN *et al.*, 1993; HASBOLD *et al.*, 1999). A imunização de camundongos com um fator de virulência presente nas formas amastigotas de *L. donovani*, a proteína A2, que foi utilizada posteriormente para o desenvolvimento da vacina Leish-Tec[®], confere proteção contra infecção com *L. donovani* associada a resposta Th1/Th2 (GHOSH *et al.*, 2001). Em estudo experimental da resposta imune Th1 e Th2 para avaliar a competência de camundongos BALB/c infectados por *L. infantum chagasi* em estabelecer e manter a infecção, foi visto que houve produção equivalente dos dois tipos de isotipos IgG1 e IgG2a, demonstrando uma resposta balanceada Th1/Th2 que não impediu a disseminação precoce do parasito nesses camundongos (ROLÃO *et al.*, 2007).

Além dos antígenos utilizados na formulação das vacinas, muitas vezes a presença de um adjuvante é indispensável para a obtenção de uma resposta imune intensa e duradoura (MCKEE *et al.*, 2007). Utilizamos dois adjuvantes nesse trabalho, SAP que é indutora de intensa resposta imune Th1 e produção de IgG2a em camundongos, bem como concomitante resposta Th2 (LIU *et al.*, 2002), o que está de acordo com o fato de que os camundongos imunizados com SAP + rPLHLc tiveram produção de citocinas de padrão Th1 e produção de IgG1 e IgG2a que levou à um padrão de resposta mista Th1/Th2 no teste de imunogenicidade e um padrão de resposta Th1 no teste de proteção e o outro adjuvante utilizado nas formulações vacinais foi o AIF, que, além de estimular resposta humoral, também é capaz de estimular um padrão misto de citocinas anti/proinflamatórias como IL-4/IFN- γ (VITORIANO-SOUZA *et al.*, 2012). Porém, os

camundongos que foram imunizados com AIF + rPLHLc não produziram IL-4 e produziram em média altos níveis de IgG1 e IgG2a que levaram a um padrão de resposta Th2, que pode ser explicado baseando-se no fato de que nesse grupo, a citocina reguladora IL-10 foi produzida suficientemente para ser capaz de suprimir a produção da citocina IFN- γ , consequentemente suprimindo o padrão de resposta Th1 de caráter protetor contra a *L. infantum chagasi*.

A partir da análise dos resultados obtidos nesse trabalho, podemos concluir que os grupos imunizados com a rPLHLc, com AIF + rPLHLc e com SAP + rPLHLc conferiram imunogenicidade e proteção contra a infecção por *L. infantum chagasi*. O grupo imunizado com SAP + rPLHLc foi capaz de conferir maior proteção aos animais desafiados, pois foi o que mais reduziu a carga parasitária no baço e no fígado e o que em média mais produziu as citocinas IFN- γ , TNF, IL-2, IL-6, IL-17 e IL-10 que refletiram no efeito biológico de proteção observado. Os resultados nos fazem otimistas quanto à utilização de SAP + rPLHLc como candidata a vacina contra LV e nos levam a continuar na investigação dessa formulação vacinal, testando combinações com mais proteínas recombinantes de *L. infantum chagasi* implicadas no processo de adesão/penetração do parasito para melhorar ainda mais a eficácia da vacina.

8. CONCLUSÕES

- No teste de imunogenicidade, o grupo imunizado com rPLHLc possui padrão imunogênico capaz de direcionar para uma resposta mista Th1/Th2; já no teste de desafio, este grupo possui padrão imunogênico capaz de direcionar para uma resposta Th1;
- No teste de imunogenicidade, o grupo imunizado com AIF + rPLHLc possui padrão imunogênico capaz de direcionar para uma resposta Th2; no teste de desafio, este grupo direcionou a resposta imune tanto para Th1/Th17 quanto para Th2;
- No teste de imunogenicidade, o grupo imunizado com SAP + rPLHLc possui padrão imunogênico capaz de direcionar para uma resposta mista Th1/Th2; no teste de desafio, este grupo direcionou a resposta imune para Th1/Th17;
- Não houve produção detectável de IL-4 por culturas de esplenócitos estimulados *in vitro* com AgLc tanto provenientes dos grupos controles quanto dos grupos rPLHLc, AIF + PLHLc e SAP + PLHLc em 72 h de incubação. Isso pode ser considerado um ponto positivo na busca por uma proteção contra LV;
- O uso da tecnologia de DNA recombinante foi eficaz para a produção da proteína rPLHLc imunogênica.

9. PERSPECTIVAS DE ESTUDOS

Na literatura, vários trabalhos mostram que uma resposta imunológica capaz de gerar proteção contra a LV pode ser obtida tanto por uma via Th1 quanto por uma via mista Th1/Th2. Nossos resultados demonstraram que a rPLHLc administrada com o adjuvante SAP pode se tornar um promissor candidato vacinal, pois proporcionou tanto uma resposta imune via Th1/Th17/IL-10 quanto uma resposta mista Th1/Th2, que culminou na redução considerável da carga parasitária nos baços e fígados dos camundongos BALB/c avaliados. A partir disso, esse trabalho nos permite propor como perspectivas, a busca de uma ou mais proteínas recombinantes de *L. infantum chagasi* implicadas como fatores de virulência do parasito que possam ser combinadas com a rPLHLc para produzir formulações vacinais ainda mais eficazes contra a LV ou formulações para serem utilizadas em testes diagnósticos.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.B., LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e Molecular**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 580p; 2005.

ABDIAN, N., GHOLAMI, E., ZAHEDIFARD, F., SAFAEE, N., RAFATI, S. Evaluation of DNA/DNA and prime-boost vaccination using LPG3 against *Leishmania* major infection in susceptible BALB/c mice and its antigenic properties in human leishmaniasis. **Exp Parasitol**; v.127, p.627-636, 2011.

AFRIN, F., ANAM, K., ALI, N. Induction of partial protection against *Leishmaniadonovani* by promastigote antigens in negatively charged liposome. **J. Parasitol**; 86 (4): 730-5; 2000.

AKHOUNDI, M, KUHL, K., CANNET, A., VOTÝPKA, J., MARTY, P., DELAUNAY, P., SERENO, D. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLoS neglected tropical diseases**; v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016a.

AKHOUNDI, M. KUHL, K., CANNET, A., VOTÝPKA, J., MARTY, P., DELAUNAY, P., SERENO, D. Correction: A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**; v. 10, n. 3, p. e0004349, 3 mar. 2016b.

AKILOV, O.E., KHACHEMOUNE, A., HASAN, T. Clinical manifestations and classification of Old World cutaneous leishmaniasis. **Int J. Dermatol**; 46(2):132-42; 2007.

ALEXANDER, J., COOMBS, G. H., MOTTRAM, J. C. *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. **J. Immunol**; v.161, p.6794-6801, 1998.

ALVAR, J., APARICIO, P., ASEFFA, A., *et al.* The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. **Clin Microbiol Rev**; 21(2):334-59; 2008. Table of contents.

ALVAR, J., YACTAYO, S., BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends Parasitol**; 22:552-7; 2006.

ALVAR, J., VELEZ, I. D., BERN, C., HERRERO, M., DESJEUX, P., CANO, J., JANNIN, J., BOER, M. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS one**; v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.

ALVES, C.R., SILVA, F.S., OLIVEIRA-JUNIOR, F.O., PEREIRA, B.A.S., PIRES, F.A., PEREIRA, M.C.S. Affinity-based methods for the separation of parasite proteins. **In Affinity Chromatography**.: In Tech (in press); 2012.

AMORIM, I. F. G., DA SILVA, S. M., FIGUEIREDO, M. M.; MOURA, E. P., DE CASTRO, R. S., DE SOUZA LIMA, T. K., GONTIJO, N.F, MICHALICK, M.S.M, GOLLOB, K.J., TAFURI, W. L. Toll receptors type-2 and CR3 expression of canine monocytes and its correlation with immunohistochemistry and xenodiagnosis in visceral leishmaniasis. **PloS one**; v. 6, n. 11, p. e27679, 2011.

AMULIC, B., CAZALET, C., HAYES, G.L., METZLER, K.D., ZYCHLINSKY, A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. **Annu Rev Immunol**; 30: 459–89; 2012.

ANDRADE, A. F. B., SARAIVA, E. M. B. Lectin-binding properties of different *Leishmania* species. **Parasitology Research**; v. 85, n. 7, p. 576–581, 1999.

ANTINORI, S., CASCIO, A., PARRAVICINI, C., *et al.* Leishmaniasis among organ transplant recipients. **Lancet Infect Dis**; 8(3):191–9; 2008.

ARAUJO, M. S., DE ANDRADE, R. A., SATHLER-AVELAR, R., MAGALHAES, C. P., CARVALHO, A. T., ANDRADE, M. C., CAMPOLINA, S. S., MELLO, M. N., VIANNA, L. R.; MAYRINK, W., REIS, A. B., MALAQUIAS, L. C., ROCHA, L. M., MARTINS-FILHO, O. A. Immunological changes in canine peripheral blood leukocytes triggered by immunization with first or second generation vaccines against canine visceral leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**; v.141, p.64-75, 2011.

ARAUJO, M. S., DE ANDRADE, R. A., SATHLER-AVELAR, R., TEIXEIRACARVALHO, A., ANDRADE, M. C., VIANNA, L. R., MAYRINK, W., REIS, A. B., MALAQUIAS, L. C., MELLO, M. N., MARTINS-FILHO, O. A. T-cell derived cytokines, nitric oxide production by peripheral blood monocytes and seric anti-*Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* IgG subclass patterns following immunization against canine visceral leishmaniasis using Leishvaccine and Leishmune. **Vaccine**; v.27, p.1008-1017, 2009.

AWANE, M., ANDRES, P. G., LI, D. J., REINECKER, H. C.; NF-kappa B-inducing kinase is a common mediator of IL-17-, TNF-alpha-, and IL-1 beta- induced chemokine promoter activation in intestinal epithelial cells. **J. Immunol**; v. 162, p. 5337-5344, 1999.

AZEVEDO-PEREIRA, R. L. PEREIRA, M.C.S., OLIVEIRA-JUNIOR, F.O.R., BRAZIL, R.P., CÔRTEZ, L.M.C., MADEIRA, M.F., SANTOS, A.L.S., TOMA, L., ALVES, C. R. Heparin binding proteins from *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. **Veterinary Parasitology**; v. 145, n. 3-4, p. 234–239, 2007.

BAMBINO-MEDEIROS, R., OLIVEIRA, F. O., CALVET, C. M., VICENTE, D., TOMA, L., KRIEGER, M. A., MEIRELLES, M. N., PEREIRA, M. C. Involvement of host cell heparan sulfate proteoglycan in *Trypanosoma cruzi* amastigote attachment and invasion. **Parasitology**; v.138, p.593-601, 2011.

BANERJEE, A. BHATTACHARYA, P., JOSHI, A. B., ISMAIL, N., DEY, R., NAKHASI, H.L. Role of pro-inflammatory cytokine IL-17 in *Leishmania* pathogenesis and in protective immunity by *Leishmania* vaccines. **Cellular Immunology**; p. 6–10, 2016.

BARATA, R. A. PEIXOTO, J.C., TANURE, A., GOMES, M.E., APOLINÁRIO, E.C., BODEVAN, E.C., DE ARAÚJO, H.S., DIAS, E.S., PINHEIRO, A.C. Epidemiology of visceral leishmaniasis in a reemerging focus of intense transmission in Minas Gerais State, Brazil. **BioMed Research International**; v. 2013, 2013.

BARBOSA-LORENZI, V.C., BURANELLO, P.A. DE A., ROQUE-BARREIRA, M.C., JAMUR, M.C., OLIVER, C., *et al.* The lectin ArtinM binds to mast cells inducing cell activation and mediator release. **Biochem Biophys Res Commun**; 416: 318–324; 2011. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.11.033 PMID: 22108054

BARRAL, A., BARRAL-NETTO, M., YONG, E.C., BROWNELL, C.E., TWARDZIK, D.R., REED, S.G. Transforming growth factor α as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**; 90: 3442-3446; 1993.

BEAUTY, B.J., MARQUARDT, W.C..The Biology of Disease Vectors.**University Press of Colorado**; 1996.

BELKAID, Y., MENDEZ, S., LIRA, R., KADAMBI, N., MILON, G., SACKS, D. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. **J Immunol**, v. 15, p.969-77, 2000.

BELO, V. S., WERNECK, G.L., BARBOSA, D.S., SIMÕES, T.C., NASCIMENTO, B.W.L., DA SILVA, E. S., STRUCHINER, C.J. Factors Associated with Visceral Leishmaniasis in the Americas: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**; v. 7, n. 4, p. e2182, 25 abr. 2013.

BERMAN, J.D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clin Infect Dis**;24(4):684–703; 1997.

BHATTACHARYA, P., ALI, N. Involvement and interactions of different immune cells and their cytokines in human visceral leishmaniasis.**Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**; v. 46, n. 2, p. 128–134, 2013.

BIFELD, E., CLOS, J. The genetics of *Leishmania* virulence. **Medical Microbiology and Immunology**; v. 204, n.6, p. 619–634, 2015.

BLANCHETTE, J., RACETTE, N., FAURE, R., SIMINOVITCH, K.A., OLIVIER, M. *Leishmania*-induced increases in activation of macrophage SHP-I tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN- γ -triggered Jak2 activation. **European Journal of Immunology**; 29: 3737-3744; 1999.

BOGDAN, C. Leishmaniasis in rheumatology, haematology and oncology: epidemiological, immunological and clinical aspects and caveats. **Ann Rheum Dis**;71(Suppl 2):i60–6; 2012.

BORJA-CABRERA, G. P., SANTOS, F.N., BAUER, F.S., PARRA, L.E., MENZ, I., MORGADO, A.A., SOARES, I.S., BATISTA, L.M.M., PALATNIK-DE-SOUSA, C.B. Immunogenicity assay of the Leishmune vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Vaccine**; v. 26, n. 39, p. 4991–4997, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Departamento de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Ministério da Saúde. Brasília**; 2014b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Interministerial nº 1.426, de 11 de julho de 2008. Proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e dá outras providências. **Diário Oficial da União**; 2015b. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/pri1426_11_07_2008.html. Acesso em 19/04/2015.

BRAZIL, R. P., RODRIGUES, A. A. F., ANDRADE FILHO, J. D. Sand fly vectors of *Leishmania* in the Americas - a mini review. **Entomology, Ornithology and Herpetology**; v. 4, p. 144, 2015.

BRITTINGHAM, A., MORRISON, C.J., MCMASTER, W.R., MCGWIRE, B.S., CHANG, K.P., MOSSER, D.M. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. **The Journal of Immunology**; 155: 3102-3111; 1995.

BRITTINGHAM, A., MOSSER, D. M. Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes. **Parasitol Today**; v.12, p.444-447, 1996.

BUTCHER, B.A., SHOME, K., ESTES, L.W., CHOAY, J., PETITOU, M., SIE, P., GLEW, R.H.: *Leishmania donovani*: cell-surface heparin receptors of promastigotes are recruited from an internal pool after trypsinization. **Exp Parasitol**; 71:49–59; 1990.

BUTCHER, B.A., SKLAR, L.A., SEAMER, L.C., GLEW, R.H.: Heparin enhances the interaction of infective *Leishmania donovani* promastigotes with mouse peritoneal

macrophages. A fluorescence flow cytometric analysis. **J. Immunol**; 148:2879–2886; 1992.

BUXBAUM, L. U., DENISE, H., COOMBS, G. H., ALEXANDER, J., MOTTRAM, J. C., SCOTT, P. Cysteine protease B of *Leishmania mexicana* inhibits host Th1 responses and protective immunity. **J. Immunol**; v.171, p.3711-3717, 2003.

CARDOSO, M.R.D., MOTA, C.M., RIBEIRO, D.P., SANTIAGO, F.M., CARVALHO, J. V., *et al.* ArtinM, a d-mannosebinding lectin from *Artocarpus integrifolia*, plays a potent adjuvant and immunostimulatory role in immunization against *Neospora caninum*. **Vaccine**; 29: 9183–9193; 2011.doi: 10.1016/j.vaccine.2011.09.136 PMID: 22001880

CASTELLANO, L. R. C. Anti-*Leishmania* immune response and evasion mechanisms. **VITAE Academia Biomédica Digital**; Número 25, 2005. <http://www.bioline.org.br/request?va05017>

CELIO, M., MARZOCHI, D. A. Editorial Visceral leishmaniasis in Southern Rio de Janeiro State and the risk of propagation to São Paulo State , Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**; v. 49, n. April, p. 147–149, 2016.

CHAKRAVARTY, J., KUMAR, S., TRIVEDI, S., RAI, V.K., SINGH, A., ASHMAN, J.A., LAUGHLIN, E.M., COLER, R.N., KAHN, S.J., BECKMANN, A.M., COWGILL, K.D., REED, S.G., SUNDAR, S., PIAZZA, F.M. A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1+MPL-SE vaccine for use in the prevention of visceral leishmaniasis. **Vaccine**; v. 29, n. 19, p. 3531–3537, 2011.

CHAMAKH-AYARI, R., BRAS-GOLÇALVES, R., BAHJ-JADER, N., PETITDIDIER, E., MARKIKOU-OUNI, W., AOUN, K., MORENO, J., CARRILLO, E., SALOTRA, P., KAUSHAL, H., NEGI, N.S., AREVALO, J., FALCONI-AGAPITO, F., PRIVAT, A., CRUZ, M., PAGNIEZ, J. PAPIEROK, G.M., RHOUMA, F.B.H., TORRES, P., LEMESRE, J.L., CHENIK, M., MEDDEB-GARNAOUI, A. In vitro evaluation of a soluble *Leishmania* promastigote surface antigen as a potential vaccine candidate against human leishmaniasis. **PLoS One**; v. 9, n. 5, p. 1–12, 2014.

CHANCE, B., SIES, H., BOVERIS, A.; Hydroperoxide metabolism in mammalian organs; **Physiol Rev**; Jul;59(3):527-605; 1979.

CHEN, R., RASTOGI, S., MULLEN, J., HAYES, S., COCHI, S., DONLON, J., *et al.* The vaccine adverse event reporting system (VAERS). **Vaccine**; 12(6):542—550, 1994.

CHOUDHURY, R., DAS, P., DE, T., CHAKRABORTI, T.; 115 kDa serine protease confers sustained protection to visceral leishmaniasis caused by *Leishmania donovani* via IFN- γ induced down-regulation of TNF- α mediated MMP-9 activity. **Immunobiology**; 218 (1), 114, 2013.

CIFANI, C., COSTANTINO, S., MASSI, M., BERRINO, L. Commercially available lipid formulations of amphotericin b: are they bioequivalent and therapeutically equivalent? **Acta Biomed**; v.83, p.154-163, 2012.

COFFMAN, R. L., LEBMAN, D. A., ROTHMAN, P. Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching. **Adv Immunol**;v.54, p.229-270, 1993.

COLTRI, K.C., OLIVEIRA, L.L., PINZAN, C.F., VENDRUSCOLO, P.E., MARTINEZ, R., *et al.* Therapeutic administration of KM+ lectin protects mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection via interleukin-12 production in a toll-like receptor 2-dependent mechanism. **Am J Pathol**; 173: 423–432; 2008.doi: 10.2353/ajpath.2008.080126 PMID: 18599609

COLTRI, K.C., OLIVEIRA, L.L., RUAS, L.P., VENDRUSCOLO, P.E., GOLDMAN, M.H., *et al.* Protection against *Paracoccidioides brasiliensis* infection conferred by the prophylactic administration of native and recombinant ArtinM. **Med Mycol**; 48: 792–799; 2010. doi: 10.3109/13693780903501671 PMID: 20392144

COSTA, C.H.N. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cad Saude Publica**; 24(12): 2959–63; 2008.

COSTA, L. E., GOULART, L.R., PEREIRA, N.C.J., LIMA, M.I.S., DUARTE, M.C., MARTINS, V.T., LAGE, P.S., MENEZES-SOUZA, D., RIBEIRO, T.G., MELO, M.N., FERNANDES, A.P., SOTO, M., TAVARES, C.A.P., CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A., COELHO, E.A.F. Mimotope-based vaccines of *Leishmania infantum* antigens and their protective efficacy against visceral leishmaniasis. **PloS one**; v. 9, n. 10, p. e110014, 15 out. 2014.

COTA, G. F., DE SOUSA, M. R., FEREGUETTI, T. O., RABELLO, A. Efficacy of anti-leishmania therapy in visceral leishmaniasis among HIV infected patients: a systematic review with indirect comparison. **PLoS Negl Trop Dis**; v.7, p.e2195, 2013.

COUTINHO, M. T., BUENO, L. L., STERZIK, A., FUJIWARA, R. T., BOTELHO, J. R., MARIA, M., GENARO, O., LINARDI, P. M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology, Amsterdam**; v. 128, p. 149–155, 2005.

CROFT, S.L., COOMBS, G.H. Leishmaniasis—Current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends Parasitol**; 19, 502–508, 2003.

CROFT, S.L., SUNDAR, S., FAIRLAMB, A.H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clin.Microbiol**; Rev. 19, 111–126, 2006.

CUNNINGHAM, A.C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Exp. Mol. Pathol.**; v. 72, p. 132-141, 2002.

CUPOLILLO, E., GRIMALDI, G., JR.; MOMEN, H.A general classification of New World Leishmania using numerical zymotaxonomy. **Am J Trop Med Hyg**; v.50, p.296-311, 1994.

DA SILVA, T., DE SOUZA, M., CECÍLIO, N., ROQUE-BARREIRA, M.. Activation of spleen cells by ArtinM may account for its immunomodulatory properties. **Cell Tissue Res**; 1–12; 2014. Available: <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-014-1879-8>.

DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniosis in South America. **Parasit Vectors**; v.2 Suppl 1, p.S1, 2009.

DANTAS-TORRES, F. Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. **Revista de Saúde Pública, São Paulo**; v.40, n.3, p.537-541, 2006.

DANTAS-TORRES, F., SOLANO-GALLEGU, L., BANETH, G., RIBEIRO, V. M., CAVALCANTI, M. P., OTRANTO, D. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. **Trends in Parasitology, Oxford**; v. 28, n. 12, p. 531-538, 2012.

DAVIES, C. R., REITHINGER, R., CAMPBELL-LENDRUM, D., FELICIANGELI, D., BORGES, R., RODRIGUEZ, N. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. **Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro**; v. 16, n. 4, p. 925–950, 2000.

DE ALMEIDA MARQUES-DA-SILVA E., DE OLIVEIRA, J. C., FIGUEIREDO, A. B., DE SOUZA LIMA, J. D., CARNEIRO, C. M., RANGEL FIETTO, J. L., CROCCO AFONSO, L. C. Extracellular nucleotide metabolism in Leishmania: influence of adenosine in the establishment of infection. **Microbes Infect**; v.10, p.850-857, 2008.

DE CASTRO CORTES, L. M., DE SOUZA PEREIRA, M. C., DA SILVA, F. S., PEREIRA, B. A., DE OLIVEIRA JUNIOR, F. O., DE ARAUJO SOARES, R. O., BRAZIL, R. P.; TOMA, L., VICENTE, C. M., NADER, H. B., DE FATIMA, M. M., BELLO, F. J., ALVES, C. R. Participation of heparin binding proteins from the surface of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes in the adhesion of parasites to *Lutzomyia longipalpis* cells (Lulo) in vitro. **Parasit Vectors**; v.5, p.142, 2012a.

DE CASTRO CORTES, L. M., DE SOUZA PEREIRA, M.C., DE OLIVEIRA, F.O.R., CORTE-REAL, S., DA SILVA, F.S., PEREIRA, B.A.S., DE FÁTIMA MADEIRA, M., DE MORAES, M.T.B., BRAZIL, R., ALVES, C.R. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: insights on subcellular distribution and biochemical properties of heparin-binding proteins. **Parasitology**; v. 139, n. 2, p. 200–7, 2012b.

DE FREITAS, E. O. LEORATTI, F.M.S., FREIRE-DE-LIMA, C.G., MORROT, A., FEIJÓ, D. The Contribution of Immune Evasive Mechanisms to Parasite Persistence in Visceral Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**; v. 7, n. April, p. 1–7; 2016.

DE JESUS PEREIRA, N. C., RÉGIS, W.C.B., COSTA, L.E., DE OLIVEIRA, J.S., DA SILVA, A.G., MARTINS, V. T., DUARTE, M.C., DE SOUZA, J.R.R, LAGE, P.S., SCHENEIDER, M.S., MELO, M.N., SOTO, M., SOARES, S.A., TAVARES, C.A.P., CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A., COELHO, E.A.F. Evaluation of adjuvant activity of fractions derived from *Agaricus blazei*, when in association with the recombinant LiHyp1 protein, to protect against visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**; v. 153, p. 180–190, 2015.

DE MENDONÇA, S. C. F., CYSNE-FINKELSTEIN, L., MATOS, D. C. DE S. Kinetoplastid membrane protein-11 as a vaccine candidate and a virulence factor in *Leishmania*. **Frontiers in Immunology**; v. 6, n. OCT, p. 1–6, 2015.

DENISE, H., MCNEIL, K., BROOKS, D. R., ALEXANDER, J., COOMBS, G. H., MOTTRAM, J. C. Expression of multiple CPB genes encoding cysteine proteases is required for *Leishmania mexicana* virulence in vivo. **Infect Immun**; v.71, p.3190-3195, 2003.

DERMINE, J.F., SCIANIMANICO, S., PRIVE, C., DESCOTEAUX, A., DESJARDINS, M. *Leishmania* promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis. **Cellular Microbiology**; 2: 115 126; 2000.

DESJARDINS, M., DESCOTEAUX, A. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. **Journal of Experimental Medicine**; 185: 2061-2068; 1997.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Elsevier. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**; v. 27, p.305-318.USA, 2004. ISSN 0147-9571

DING, A. H., NATHAN, C. F., STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **J.Immunol**;v.141, p.2407-2412, 1988.

DOSTALOVA, A., VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasit Vectors**; v.5, p.276, 2012.

EL HAG, I.A., HASHIM, F.A., EL TOUM, A., HOMEIDA, M., EL KALIFA, M. & EL HASSAN, A.M., Liver morphology and function in visceral leishmaniasis (Kalaazar). **J Clin Pathol**; 47:547-551; 1994.

ELLIS, R.W. New and improved vaccines against Hepatitis B. I. Recombinant derives hepatitis B vaccine. In: Woodrow GC, Levine MM. **New generation vaccines. Marcel Dekker Inc.**; 439-447, 1990.

ESCH, K. J., PETERSEN, C. A. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. **Clin Microbiol Rev**; v.26, p.58-85, 2013.

FALEIRO, R. J. KUMAR, R., HAFNER, L.M., ENGWERDA, C.R. Immune Regulation during Chronic Visceral Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**; v. 8, n. 7, p. e2914, 2014.

FERNANDES, A. P., COSTA, M.M.S., COELHO, E.A.F., MICHALICK, M.S.M., DE FREITAS, E., MELO, M.N., LUIZ TAFURI, W., RESENDE, D.M., HERMONT, V., ABRANTES, C.F., GAZZINELLI, R.T. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**; v. 26, n. 46, p. 5888–5895, 2008.

FERNANDES, C. B., JUNIOR, J. T., DE, J. C., SOUZA, B. M., LARANGEIRA, D. F., FRAGA, D. B., TAVARES VERAS, P. S., BARROUIN-MELO, S. M. Comparison of two commercial vaccines against visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas: IgG, and subclasses, parasitism, and parasite transmission by xenodiagnosis. **Vaccine**; v.32, p.1287-1295, 2014b.

FIROUZMAND, H., BADIEE, A., KHAMESIPOUR, A., HERAVI, SHARGH, V., ALAVIZADEH, S.H., ABBASI, A., JAAFARI, M.R. Induction of protection against leishmaniasis in susceptible BALB/c mice using simple DOTAP cationic nanoliposomes containing soluble *Leishmania* antigen (SLA). **Acta Tropica**; v. 128, n. 3, p. 528–535, 2013.

FORGET, G., SIMINOVITCH, K.A., BROCHU, S., RIVEST, S., RADZIOCH, D., OLIVIER, M. Role of host phosphotyrosine phosphatase SHP-I in the development of murine Leishmaniasis. **European Journal of Immunology**; 31: 3185-3196; 2001.

FREZARD, F., DEMICHELI, C., RIBEIRO, R.R. Pentavalent antimonials: New perspectives for old drugs. **Molecules**; 14, 2317–2336, 2009.

GALATI, E. A. B. Classificação de Phlebotominae. In RANGEL, E. F.; LAINSON R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil, Rio de Janeiro: FIOCRUZ**;p. 23-51; 2003.

GARCIA BUSTOS, M.F., BARRIO, A., GONZALEZ PRIETO, G., DE MOLINA RASPI, E., CIMINO, R., CARDOZO, R.M., PARADA, L.A., YEO, M.; SOTO, J., UNCOS, D.A., *et al.* In Vivo Antileishmanial Efficacy of Miltefosine against *Leishmania (Leishmania) Amazonensis*. **J. Parasitol**; 100, 840–847, 2014.

GAUTAM, N., OLOFSSON, A.M., HERWALD, H. *et al.* Heparin-binding protein (HBP/CAP37): a missing link in neutrophil-evoked alteration of vascular permeability. **Nat Med**; 7: 1123–7; 2001.

GEURTSSEN, J., CHEDAMMI, S., MESTERS, J., COT, M., DRIESSEN, N. N., SAMBOU, T., KAKUTANI, R., UMMELS, R., MAASKANT, J., TAKATA, H.,

BABA, O., TERASHIMA, T., BOVIN, N., VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M., NIGOU, J., PUZO, G., LEMASSU, A., DAFPE, M., APPELMELK, B. J. Identification of mycobacterial alpha-glucan as a novel ligand for DC-SIGN: involvement of mycobacterial capsular polysaccharides in host immune modulation. **J. Immunol**; v.183, p.5221-5231, 2009.

GHALIB, H. W., PIUVEZAM, M.R., SKEIKY, Y.A.W., SIDDIG, M., HASHIM, F.A., EL-HASSAN, A.M., RUSSO, D.M., REED, S.G. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. **Journal of Clinical Investigation**; v. 92, n. 1, p. 324–329, 1993.

GHOSH, A., ZHANG, W. W., MATLASHEWSKI, G. Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and a humoral response which protects mice against *Leishmania donovani* infections. **Vaccine**; v.20, p.59-66, 2001.

GHOSHAL, A., MUKHOPADHYAY, S., SAHA, B., MANDAL, C. 9-O-acetylated sialoglycoproteins are important immunomodulators in Indian visceral leishmaniasis. **Clin Vaccine Immunol**; v.16, p.889-898, 2009.

GIDWANI, K., JONES, S., KUMAR, R., BOELAERT, M., SUNDAR, S. Interferon-gamma release assay (modified QuantiFERON) as a potential marker of infection for *Leishmania donovani*, a proof of concept study. **PLoS Negl Trop Dis**; 5, p. e1042; 2011.

GILLESPIE, P. M., BEAUMIER, C.M., STRYCH, U., HAYWARD, T., HOTEZ, P.J., BOTTAZZI, M.H. Status of vaccine research and development of vaccines for leishmaniasis. **Vaccine**; v. 34, n. 26, p. 2992–2995, jun. 2016.

GIORGIONE, J.R., TURCO, S.J., EPAND, R.M. Transbilayer inhibition of protein kinase C by the lipophosphoglycan from *Leishmania donovani*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**; 93: 11634-11639; 1996.

GIUDICE, A., VENDRAME, C., BEZERRA, C., CARVALHO, L. P., DELAVECHIA, T., CARVALHO, E. M., BACELLAR, O. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. **BMC Infect Dis**; v.12, p.75, 2012.

GONTIJO, C.M.F., MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: Quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev Bras Epidemiol**; 7(3): 338–49; 2004.

GONZALEZ-ASEGUINOLAZA, G., TALADRIZ, S., MARQUET, A., LARRAGA, V. Molecular cloning, cell localization and binding affinity to DNA replication proteins of the p36/LACK protective antigen from *Leishmania infantum*. **Eur J Biochem**; v.259, p.909-916, 1999.

GOTO, Y., BHATIA, A., RAMAN, V. S., VIDAL, S. E., BERTHOLET, S., COLER, R. N., HOWARD, R. F., REED, S. G. Leishmania infantum sterol 24 cmethyltransferase formulated with MPL-SE induces cross-protection against L. major infection. **Vaccine**; v.27, p.2884-2890, 2009.

GRADONI, L. Canine Leishmania vaccines: Still a long way to go. **Veterinary Parasitology**; v. 208, n. 1-2, p. 94–100, 2015.

GRADONI, L., ASCENZI, P. [Nitric oxide and anti-protozoan chemotherapy]. **Parasitologia**; v.46, p.101-103, 2004.

GREEN, L. C., WAGNER, D. A., GLOGOWSKI, J., SKIPPER, P. L., WISHNOK, J. S., TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Anal Biochem**; v.126, p.131-138, 1982.

GRIMALDI JR. G., DAVID, J.R., MCMAHON-PRATT, D. Identification and distribution of New World Leishmania species characterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies. **Am J Trop Med Hyg.**; v. 36, p. 270-287, 1987.

HANDLER, M. Z., PATEL, P.A., KAPILA, R., AL-QUBATI, Y., SCHWARTZ, R.A. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Clinical perspectives. **Journal of the American Academy of Dermatology**; v. 73, n. 6, p. 897–908, 2015.

HANDMAN, E., BULLEN, D. V. Interaction of Leishmania with the host macrophage. **Trends Parasitol**; v.18, p.332-334, 2002.

HARHAY, M.O., OLLIARO, P.L., COSTA, D.L., COSTA, C.H. Urban parasitology:Visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends Parasitol**;27(9): 403–9; 2011.

HASBOLD, J., HONG, J. S., KEHRY, M. R., HODGKIN, P. D. Integrating signals from IFN-gamma and IL-4 by B cells: positive and negative effects on CD40 ligand-induced proliferation, survival, and division-linked isotype switching to IgG1, IgE, and IgG2a. **J. Immunol**;v.163, p.4175-4181, 1999.

HENKE, A. DNA immunization – a new chance in vaccine research? **Medical microbiology and immunology**, Berlin, v.191, p.187-190, 2002.

HERAVI SHARGH, V., JAAFARI, M.R., KHAMESIPOUR, A., JALALI, S.A., FIROUZMAND, H., ABBASI, A., BADIIE, A. Cationic liposomes containing soluble Leishmania antigens (SLA) plus CpG ODNs induce protection against murine model of leishmaniasis. **Parasitology Research**; v. 111, n. 1, p. 105–114, 2012.

IBARRA-MENESES A.V., CARRILLO E., SÁNCHEZ C., GARCÍA-MARTÍNEZ J. *et al.* Interleukin-2 as a marker for detecting asymptomatic individuals in areas where *Leishmania infantum* is endemic. **Clinical Microbiology and Infection**; p. 739 e1-739.e4; 2016.

JAIN, K., JAIN, N. K. Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. **Journal of Immunological Methods**; v. 422, p. 1–12, 2015.

KANE, M.M., MOSSER, D.M. The role of IL-10 in promoting disease progression in Leishmaniasis. **The Journal of Immunology**; 166: 1141-1147; 2001.

KAYE, P.M., ROGERS, N.J., CURRY, A.J., SCOTT, J.C. Deficient expression of co-stimulatory molecules on Leishmania-infected macrophages. **European Journal of Immunology**; 24: 2850-2854; 1994.

KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis. **Hum Vaccin**; v.7, p.1204-1214, 2011.

KEVRIC, I., CAPPEL, M. A., KEELING, J. H. New World and Old World Leishmania Infections: A Practical Review. **Dermatologic Clinics**; v. 33, n. 3, p. 579–593, 2015.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical Veterinary Entomology**; v. 4, p. 1-24, 1990.

KILLICK-KENDRICK, R. Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between leishmaniae and their phlebotomine vectors. **Bull Soc Path Exot.**; v. 78, p. 747-755, 1985.

KIMA, P. E., SOONG, L. Interferon gamma in leishmaniasis. **Front Immunol**; v.4, p.156, 2013.

KOCK, N.P., GABIUS, H.J., SCHMITZ, J., SCHOTTELIU, J.: Receptors for carbohydrate ligands including heparin on the cell surface of Leishmania and other trypanosomatids. **Trop Med Int Health**; 2:863–874; 1997.

KOMATH, S. S., KAVITHA, M., SWAMY, M. J. Beyond carbohydrate binding: new directions in plant lectin research. **Organic & biomolecular chemistry**; v. 4, n. 6, p. 973–988, 2006.

KUMAR, R., GOTO, Y., GIDWANI, K., COWGILL, K.D., SUNDAR, S., REED, S.G. Evaluation of Ex Vivo human immune response against candidate antigens for a visceral leishmaniasis vaccine. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**; v. 82, n. 5, p. 808–813, 2010.

LAINSON, R., SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. The leishmaniasis in biology and medicine. **London: Academic Press**; p. 12-120; 1987.

LAINSON, R. & RANGEL, E. F. Lutzomyia longipalpis and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**; v. 100(8), p. 811-827, 2005.

LAINSON, R., SHAW, J. J. Observations on the development of *Leishmania (L.) infantum* chagasi Cunha and Chagas in the midgut of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva). **Ann Parasitol Hum Comp**; v.63, p.134-145, 1988.

LARA-SILVA, F. DE O., MICHALSKY, E.M., FORTES-DIAS, C.L., FIUZA, V. O.P., PESSANHA, J.E.M., REGINA-SILVA, S., DE AVELAR, D.M., SILVA, M.A., LIMA, A.C.V.M.R., DA COSTA, A.J.A., MACHADO-COELHO, G, , L.L., DIAS, E.S. Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recente transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil. **ActaTropica**; v. 148, p. 128–136, 2015.

LARRETA, R., GUZMAN, F., PATARRYO, M.E., ALONSO, C., REQUENA, J.M. Antigenic properties of the *Leishmania infantum* GRP94 and mapping of linear B-cell epitopes. **Immunol Lett**; 80 (3):199-205; 2002.

LARRETA, R., SOTO, M., ALONSO, C., REQUENA, J.M. *Leishmania infantum*: Gene cloning of the GRP94 homologue, its expression as recombinant protein, and analysis of antigenicity. **Exp Parasitol**; 96 (2): 108-115; 2000.

LEISHMAN, W. B. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. 1903. **Natl Med J India**; v.7, p.196-200, 1994.

LIAO, W., JIAN-XIN. IL-2 Family Cytokines: New Insights into the Complex Roles of IL-2 as a Broad Regulator of T helper Cell Differentiation». **Current Opinion in Immunology**; 23 (5): 598–604; 2011.

LIEW, F.Y., O'DONNELL, C.A. Immunology of leishmaniasis. **Advances in Parasitology**; 32:161–259; 1993.

LIEW, F.Y., PARKINSON, C., MILLOTT, S., SEVERN, A., CARRIER, M. Tumour necrosis factor (TNFa) in leishmaniasis. I. TNF alpha mediates host protection against cutaneous leishmaniasis. **Immunology**; 69(4):570-3; 1990.

LINDOSO, J.A.L., CUNHA, M.A., QUEIROZ, I. T., MOREIRA, C. H. V. Leishmaniasis–HIV coinfection: current challenges. **Dovepress**; 8, p. 147–156, 2016; <http://dx.doi.org/10.2147/HIV.S93789>

LIU, G., ANDERSON, C., SCALTRETO, H., BARBON, J., KENSIL, C. R. QS-21 structure/function studies: effect of acylation on adjuvant activity. **Vaccine**; v.20, p.2808-2815, 2002.

LO, S. K., BOVIS, L., MATURA, R., ZHU, B., HE, S., LUM, H., TURCO, S. J., HO, J. L. *Leishmania* lipophosphoglycan reduces monocyte transendothelial migration: modulation of cell adhesion molecules, intercellular junctional proteins, and chemoattractants. **J. Immunol**; v.160, p.1857-1865, 1998.

LOEUILLET, C.; BAÑULS, A.-L.; HIDE, M. Study of *Leishmania* pathogenesis in mice: experimental considerations. **Parasites & vectors**; v. 9, n. 1, p. 144, 2016.

LOPEZ KOSTKA, S., DINGES, S., GRIEWANK, K., IWAKURA, Y., UDEY, M.C., VON, STEBUT, E. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**; v. 182, n. 5, p.3039–46, 2009.

LOVE, D. C., ESKO, J. D., MOSSER, D. M.A heparin-binding activity on *Leishmania* amastigotes which mediates adhesion to cellular proteoglycans.**J Cell Biol**;v.123,p.759-766, 1993.

LOWRY, OLIVER H., ROSEBROUGH, A. LEWIS FARR, RANDALL, R. J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. **J Biol Chem**; v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

LOYOLA, W., CUSTODIO, L.A., FELIPE, I., CONCHON-COSTA, I., CARVALHO, P.G. DE, *et al.* Artin M enhances TNF- α production and phagocytosis of *Candida albicans* mediated by dectin-1 and mannose receptors. **Int Immunopharmacol**; 12: 378–383; 2012. doi: 10.1016/j.intimp.2011.12.010 PMID: 22207010

LUPI, O., BARTLETT, B.L., HAUGEN, R.N., *et al.* Tropical dermatology: tropical diseases caused by protozoa. **J Am Acad Dermatol**; 60(6):897–925 [quiz: 926–8]; 2009.

MALTEZOU, H.C., SIAFAS, C., MAVRIKOU, M., *et al.* Visceral leishmaniasis during childhood in southern Greece.**Clin Infect Dis**; 31(5):1139–43; 2000.

MARIANO, V.S., ZORZETTO-FERNANDES, A.L., DA SILVA, T.A., RUAS, L.P., NOHARA, L.L., *et al.*Recognition of TLR2 N-glycans: critical role in ArtinM immunomodulatory activity. **PLoS One**; 9: e98512; 2014. Available: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0098512>. doi: 10.1371/journal.pone. 0098512 PMID: 24892697

MARKOVIC, S. N., MURASKO, D. M. Anesthesia inhibits poly I:C induced stimulation of natural killer cell cytotoxicity in mice. **Clin Immunol Immunopathol**; v.56, p.202-209, 1990.

MARQUES-DA-SILVA, E. A., COELHO, E.A.F., GOMES, D.C.O., VILELA, M.C., MASIOLI, C.Z., TAVARES, C.A.P., FERNANDES, A.P., AFONSO, L.C.C., REZENDE, S.A. Intramuscular immunization with p36 (LACK) DNA vaccine induces IFN- γ production but does not protect BALB/c mice against *Leishmania infantum chagasi* intravenous challenge. **Parasitology Research**; v. 98, n. 1, p. 67–74, 2005.

MARTÍNEZ SALAZAR, M. B., DELGADO DOMÍNGUEZ, J., SILVA ESTRADA, J., GONZÁLEZ, B., C., BECKER, I. Vaccination with *Leishmania mexicana* LPG induces

PD-1 in CD8+ and PD-L2 in macrophages thereby suppressing the immune response: A model to assess vaccine efficacy. **Vaccine**; v. 32, n. 11, p. 1259–1265, 2014.

MARTINS, T. V. F., DE CARVALHO, T. V., DE OLIVEIRA, C.V.M., DE PAULA, S.O., CARDOSO, S.A., DE OLIVEIRA, L.L., MARQUES-DA-SILVA, E. Leishmania infantum chagasi heparin-binding protein: Cell localization and participation in L. infantum chagasi infection. **Molecular and Biochemical Parasitology**; v. 204, n. 1, p. 34–43, 2015.

MARTINS-MELO, F. R., LIMA, M. S., RAMOS, A. N., JR.,ALENCAR, C. H., HEUKELBACH, J. Mortality and case fatality due to visceral leishmaniasis in Brazil: a nationwide analysis of epidemiology, trends and spatial patterns. **PLoS One**; v.9, p.e93770, 2014.

MAURÍCIO, I.L., STOTHARD, J.R., MILES, M.A. The strange case of Leishmania infantum chagasi. **Parasitology Today**; 16(5): 188-189, 2000.

MCCALL, L. I., MATLASHEWSKI, G. Involvement of the Leishmania donovani virulence factor A2 in protection against heat and oxidative stress. **Exp Parasitol**; v.132, p.109-115, 2012.

MCCALL, L. I., MATLASHEWSKI, G. Localization and induction of the A2 virulence factor in Leishmania: evidence that A2 is a stress response protein. **Mol Microbiol**; v.77, p.518-530, 2010.

MCCALL, L. I., ZHANG, W. W., MATLASHEWSKI, G. Determinants for the development of visceral leishmaniasis disease. **PLoS Pathog**; v.9, p.e1003053, 2013a.

MCCONVILLE, M.J., TURCO, S.J., FERGUSON, M.A., SACKS, D.L. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of Leishmania major promastigotes to an infectious stage. **The EMBO Journal**; 11: 3593-3600; 1992.

MCDOWELL, M.A., SACKS, D.L. Inhibition of host cell signal transduction by Leishmania: observations relevant to the selective impairment of IL-12 responses. **Current Opinion in Microbiology**; 2: 438-443; 1999.

MCGREAL, E. P., MARTINEZ-POMARES, L., GORDON, S. Divergent roles for Ctype lectins expressed by cells of the innate immune system. **Molecular Immunology**, v. 41, n. 11 SPEC. ISS., p. 1109–1121, 2004.

MCGWIRE, B. S., SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: Clinical syndromes and treatment. **Qjm**; v. 107, n. 1, p. 7–14, 2014.

MCKEE, A. S., MUNKS, M. W., MARRACK, P. How do adjuvants work? Important considerations for new generation adjuvants. **Immunity**;v.27, p.687-690, 2007.

MEHEUS, F., BALASEGARAM, M., OLLIARO, P., SUNDAR, S., RIJAL, S., FAIZ, M.A., BOELAERT, M. Cost-effectiveness analysis of combination therapies for visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent. **PLoS Neglected Tropical Diseases**; v. 4, n. 9, 2010.

MELBY, P.C., KREUTZER, R.D., MCMAHON-PRATT, D., *et al.* Cutaneous leishmaniasis: review of 59 cases seen at the National Institutes of Health. **Clin Infect Dis**; 15(6):924–37; 1992.

MICHALSKY, É. M., FORTES-DIAS, C.L., FRANÇA-SILVA, J.C., ROCHA, M.F., BARATA, M.A., DIAS, E.S. Association of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) population density with climate variables in Montes Claros, an area of American visceral leishmaniasis transmission in the state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**; v. 104, n. 8, p. 1191–1193, 2009. MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASÍLIA. Manual de Vigilância e Controle

MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASÍLIA. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. n. 27, p. 120, 2006. (<https://agencia.fiocruz.br/leishmaniose>)

MOHAMMADI, M.R., ZEINALI, M., ARDESTANI, S.K., KARIMINIA, A. Identification of novel *Leishmania major* antigens that elicit IgG2a response in resistant and susceptible mice. **Korean J Parasitol**; 44 (1): 43-8; 2006.

MONGE-MAILLO, B., LOPEZ-VELEZ, R. Therapeutic options for visceral leishmaniasis. **Drugs**; 73, 1863–1888, 2013.

MONTALVO, A. M., FRAGA, J., MONZOTE, C. L., GARCIA, G., FONSECA, L. Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN. **Revista Cubana de Medicina Tropical, Habana**; v.64 ,n. 2, 2012.

MONZOTE, L. Current treatment of leishmaniasis: A review. **Open Antimicrob. Agents J.**; 1, 9–19, 2009.

MOORE, K.J., LABRECQUE, S., MATLASHEWSKI, G. Alteration of *Leishmania donovani* infection levels by selective impairment of macrophage signal transduction. **The Journal of Immunology**; 150: 4457-4465; 1993.

MOORE, K.J., TURCO, S.J., MATLASHEWSKI, G. *Leishmania donovani* infection enhances macrophage viability in the absence of exogenous growth factor. **Journal of Leukocyte Biology**; 55: 91-98; 1994.

MOREIRA, M. L., COSTA-PEREIRA, C., ALVES, M. L.R., MARTELETO, B.H., RIBEIRO, V.M., PERUHYPE-MAGALHÃES, V., GIUNCHETTI, R.C., MARTINSFILHO, O.A., ARAÚJO, M.S.S. Vaccination against canine leishmaniasis increases the phagocytic activity, nitric oxide production and expression of cell

activation/migration molecules in neutrophils and monocytes. **Veterinary Parasitology**; v. 220, p. 33–45, 2016.

MORENO, A.N., JAMUR, M.C., OLIVER, C., ROQUE-BARREIRA, M.C. Mast cell degranulation induced by lectins: Effect on neutrophil recruitment. **Int Arch Allergy Immunol**, 132: 221–230; 2003. doi: 10.1159/000074303 PMID: 14646383

MORENO, J., VOULDOUKIS, I., MARTINS, V., McGAHIE, D., CUISINIER, A.M., GUEGUEN, S. Use of a liesp/qa-21 vaccine (canileish) stimulates an appropriate th1-dominated cell-mediated immune response in dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**; v. 6, n. 6, 2012.

MOSSER, D.M., EDWARDS, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat Rev Immunol**; 8: 958–69; 2008.

MOSSER, D.M. The many faces of macrophage activation. **J Leukoc Biol.**; 73(2):209–12; 2003.

MOUGNEAU, E., ALTARE, F., WAKIL, A. E., ZHENG, S., COPPOLA, T., WANG, Z. E., WALDMANN, R., LOCKSLEY, R. M., GLAICHENHAUS, N. Expression cloning of a protective *Leishmania* antigen. **Science**; v.268, p.563-566, 1995.

MUELLER, M.C., FLEISCHMANN, E., GRUNKE, M., SCHEWE, S., BOGNER, J.R., LÖSCHER, T. Relapsing cutaneous leishmaniasis in a patient with ankylosing spondylitis treated with infliximab. **Am J Trop Med Hyg**; 81(1):52-4; 2009.

MURRAY, H. W., JUNGBLUTH, A., RITTER, E., MONTELIBANO, C., MARINO, M.W. Visceral leishmaniasis in mice devoid of tumor necrosis factor and response to treatment. **Infect Immun**; v. 68, n. 11, p. 6289–93., 2000.

MUTISO, J. M., MACHARIA, J. C., KIIO, M. N., ICHAGICHU, J. M., RIKOI, H., GICHERU, M. M. Development of *Leishmania* vaccines: predicting the future from past and present experience. **J Biomed Res**; v.27, p.85-102, 2013.

NAGATA, T., AOSHI, T., UCHUIMA, M., SUZUKI, M., KOIDE, Y. Cytotoxic T-lymphocyte, and helper T lymphocyte oriented DNA vaccination. **DNA and Cell Biology**, Philadelphia, v.23, n.2, p.93-106, 2004.

NATHAN, C., SHILOH, M.U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**; 97: 8841-8848; 2000.

NELMS, K., KEEGAN, A. D., ZAMORANO, J., RYAN, J. J., PAUL, W. E. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. **Annu Rev Immunol**; v.17, p.701-738, 1999.

NETO M. A. C. S. , WINTER C., TERMIGNONI C. - Leishmania: O Desenvolvimento no Inseto vetor e a Transmissão ao Hospedeiro Vertebrado – In <<Tópicos Avançados em Entomologia Molecular: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular>>**Editora Itabajara da Silva Vaz Junior, CAPÍTULO 14 - A Interação do Protozoário Leishmania com seus Insetos Vetores**; 2013.

NI, Y., TIZARD, I. Lectin-carbohydrate interaction in the immune system. **Veterinary Immunology and Immunopathology**; v. 55, n. 1-3, p. 205–223, 1996.

NO, J. H. Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries. **Acta Tropica**; v. 155, p. 113–123, 2016.

NOAZIN, S., MODABBER, F., KHAMESIPOUR, A., SMITH, P.G., MOULTON, L.H., NASSERI, K., SHARIFI, I., KHALIL, E.A.G., BERNAL, I.D.V., ANTUNES, C.M.F., KIENY, M.P., TANNER, M. First generation leishmaniasis vaccines: A review of field efficacy trials. **Vaccine**; v. 26, n. 52, p. 6759–6767, 2008.

OGAWA, T., WATANABE, M., NAGANUMA, T., MURAMOTO, K. Diversified carbohydrate-binding lectins from marine resources. **J Amino Acids**; v.2011, p.838914, 2011.

OLIVEIRA, F. O., JR., ALVES, C. R., CALVET, C. M., TOMA, L.; BOUCAS, R. I., NADER, H. B., CASTRO CORTES, L. M., KRIEGER, M. A., MEIRELLES, M. N., SOUZA PEREIRA, M. C. *Trypanosoma cruzi* heparin-binding proteins and the nature of the host cell heparan sulfate-binding domain. **Microb Pathog**; v.44, p.329-338, 2008.

OLIVEIRA, F. O., JR., ALVES, C. R., SOUZA-SILVA, F., CALVET, C. M., CORTES, L. M., GONZALEZ, M. S., TOMA, L.; BOUCAS, R. I., NADER, H. B., PEREIRA, M. C. *Trypanosoma cruzi* heparin-binding proteins mediate the adherence of epimastigotes to the midgut epithelial cells of *Rhodnius prolixus*. **Parasitology**; v.139, p.735-743, 2012.

OLIVIER, M., BROWNSEY, R.W., REINER, N.E. Defective stimulus-response coupling in human monocytes infected with *Leishmania donovani* is associated with altered activation and translocation of protein kinase C. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**; 89: 7481-7485; 1992.

OLIVIER, M., ATAYDE, V. D., ISNARD, A., HASSANI, K., SHIO, M. T. *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. **Microbes Infect**; v.14, p.1377-1389, 2012.

OUELLETTE, M., DRUMMELSMITH, J., PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: Drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resist.Update**; 7, 257–266, 2004.

PALATNIK-DE-SOUSA, C.B., DOS SANTOS, W.R., FRANÇA-SILVA, J.C., DA COSTA, R.T., REIS, A.B., PALATNIK, M., *et al.* Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **Am J Trop Med Hyg**; 65: 510–517, 2001. pmid:11716106

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B., BARBOSA, A. F., OLIVEIRA, S. M., NICO, D., BERNARDO, R. R., SANTOS, W. R., RODRIGUES, M. M., SOARES, I., BORJACABRERA, G. P. FML vaccine against canine visceral leishmaniasis: from second generation to synthetic vaccine. **Expert Rev Vaccines**; v.7, p.833-851, 2008.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B., SILVA-ANTUNES, I., MORGADO, A. A., MENZ, I., PALATNIK, M., LAVOR, C. Decrease of the incidence of human and canine visceral leishmaniasis after dog vaccination with Leishmune in Brazilian endemic areas. **Vaccine**; v.27, p.3505-3512, 2009.

PANARO, M. A., ACQUAFREDDA, A., LISI, S., LOFRUMENTO, D. D., MITOLO, V., SISTO, M., FASANELLA, A., TROTTA, T., BERTANI, F., CONSENTI, B., BRANDONISIO, O. Nitric oxide production by macrophages of dogs vaccinated with killed *Leishmania infantum* promastigotes. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**; v.24, p.187-195, 2001.

PANUNTO-CASTELO, A., SOUZA, M.A., ROQUE-BARREIRA, M-C., SILVA, J.S. KM+, a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against *Leishmania major* antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection. **Glycobiol**; 11: 1035–1042; 2001. Available: <http://glycob.oxfordjournals.org/content/11/12/1035.abstract>.

PASSERO, L. F., CARVALHO, A. K., BORDON, M. L., BONFIM-MELO, A., CARVALHO, K., KALLAS, E. G., SANTOS, B. B., TOYAMA, M. H., PAES-LEME, A., CORBETT, C. E., LAURENTI, M. D. Proteins of *Leishmania (Viannia) shawi* confer protection associated with Th1 immune response and memory generation. **Parasit Vectors**; v.5, p.64, 2012a.

PEREIRA, L., ABBEHUSEN, M., TEIXEIRA, C., CUNHA, J., NASCIMENTO, I.P. FUKUTANI, K., DOS-SANTOS, W., BARRAL, A., DE OLIVEIRA, C.I., BARRALNETTO, M., SOTO, M., BRODSKY, C.I. Vaccination with *Leishmania infantum* Acidic Ribosomal P0 but Not with Nucleosomal Histones Proteins Controls *Leishmania infantum* Infection in Hamsters. **PLoS Neglected Tropical Diseases**; v. 9, n. 2, p. 1–16, 2015.

PEREIRA-DA-SILVA, G., MORENO, A.N., MARQUES, F., OLIVER, C., CÉLIA JAMUR M., *et al.* Neutrophil activation induced by the lectin KM+ involves binding to CXCR2. **Biochim Biophys Acta—Gen Subj**; 1760: 86–94; 2006. doi: 10.1016/j.bbagen.2005.09.011

PESSOA, S.B., BARRETO, M.P. Leishmaniose tegumentar Americana. In: **Ministério da Educação e Saúde. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional**; 527; 1948.

PESSOA, S.B. Classificação das leishmanioses e das espécies do gênero *Leishmania*. **Arq Hig Saude Pub.**;26:41-50; 1961.

PINELLI, E., *et al.* Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**; v. 62, n. 1, p. 229–235, 1994a.

PINELLI, E., *et al.* Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and immunity**; v. 62, n. 1, p. 229–35, 1994b.

PINELLI, E., GEBHARD, D., MOMMAAS, A.M., VAN HOEIJ, M., LANGERMANS, J.A., RUITENBERG, E.J., RUTTEN, V.P. Infection of a canine macrophage cell line with *Leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and antileishmanial activity. **Vet. Parasitol.**; n. 92, p.181-9, 2000.

PIPIROU, Z., POWLESLAND, A. S., STEFFEN, I., POHLMANN, S., TAYLOR, M. E., DRICKAMER, K. Mouse LSECtin as a model for a human Ebola virus receptor. **Glycobiology**; 2011.

PIRDEL, L., HOSSEINI, A.Z., KAZEMI, B., RASOULI, M., BANDEHPOUR, M., SOUDI, S. Cloning and Expression of *Leishmania infantum* LPG3 Gene by the Lizard *Leishmania* Expression System. **Avicenna J Med Biotechnol**; 4:186-92; 2012.

PIRDEL, L., HOSSEINI, A.Z., RASOULI, M. Immune response in susceptible BALB/c mice immunized with DNA encoding Lipophosphoglycan 3 of *Leishmania infantum*. **Parasite immunol**; 36:700-7; 2014.

PIRDEL, L., FARAJNIA, S. A non-pathogenic recombinant *Leishmania* expressing Lipophosphoglycan 3 against experimental infection with *Leishmania infantum*. **Scand J Immunol**; Accepted Author Manuscript. doi:10.1111/sji.12557; 2017.

PITTA, M. G. R., ROMANO, A., CABANTOUS, S., HENRI, S., HAMMAD, A., KOURIBA, B., ARGIRO, L., EL KHEIR, M., BUCHETON, B., MARY, C., EL-SAFI, S.H., DESSEIN, A. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kalaazar caused by *Leishmania donovani*. **Journal of Clinical Investigation**; v. 119, n. 8, p. 2379–2387, 2009.

PRADO, P. F. DO, ROCHA, M.F., SOUSA, J.F.DE, CALDEIRA, D.I., PAZ, G.F., DIAS, E.S. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Montes Claros, State of Minas Gerais, Brazil, between 2007 and 2009. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**; v. 44, n. 5, p. 561–566, 2011.

PRESS, D. Magnitude of visceral leishmaniasis and poor treatment outcome among HIV patients : meta- analysis and systematic review. p. 75–81, 2016.

PUENTES, S.M., DA SILVA, R.P., SACKS, D.L., HAMMER, C.H., JOINER, K.A. Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. **The Journal of Immunology**; 145: 4311-4316; 1990.

READY, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clinical Epidemiology**; v. 6, n. 1, p. 147–154, 2014.

REINER, N.E., NG, W., MCMASTER, W.R. Parasite accessory cell interactions in murine leishmaniasis. II. *Leishmania donovani* supresses macrophage expression of class I and class II major histocompatibility complex gene products. **The Journal of Immunology**; 138: 1926-1932; 1987.

RESENDE, L. A., ROATT, B. M., GUIAR-SOARES, R. D., VIANA, K. F., MENDONCA, L. Z., LANNA, M. F., SILVEIRA-LEMOS, D., CORREA-OLIVEIRA, R., MARTINS-FILHO, O. A., FUJIWARA, R. T., CARNEIRO, C. M., REIS, A. B., GIUNCHETTI, R. C. Cytokine and nitric oxide patterns in dogs immunized with LBSap vaccine, before and after experimental challenge with *Leishmania infantum chagasi* plus saliva of *Lutzomyia longipalpis*. **Vet Parasitol**;v.198, p.371-381, 2013.

RHALEM, A., *et al.* Immune response against *Leishmania* antigens in dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary parasitology**; v. 81, n. 3, p. 173–84, 1999a.

RHALEM, A., *et al.* Immune response against *Leishmania* antigens in dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**; 1999b.

RIBEIRO-GOMES, F. L., SACKS, D. The influence of early neutrophil-*Leishmania* interactions on the host immune response to infection. **Front Cell Infect Microbiol**; v.2, p.59, 2012.

RIOUX, J. A., LANOTTE, G., SERRES, E., PRATLONG, F., BASTIEN, P., PERIERES, J. Taxonomy of *Leishmania* using isoenzymes. Suggestions for a new classification. **Ann Parasitol Hum Comp**; v. 65, p. 111-125, 1990.

RITTIG, M.G., BOGDAN, C. *Leishmania*-host cell interaction: complexities and alternative views. **Parasitology Today**; 16: 292-297; 2000.

ROATT, B. M., GUIAR-SOARES, R. D., COURA-VITAL, W., KER, H. G., MOREIRA, N., VITORIANO-SOUZA, J., GIUNCHETTI, R. C., CARNEIRO, C. M., REIS, A. B. Immunotherapy and Immunochemotherapy in Visceral Leishmaniasis: Promising Treatments for this Neglected Disease. **Front Immunol**; v.5, p.272, 2014.

RODRIGUES, V.J.R., SANTANA DA SILVA, J., CAMPOS-NETO, A. Transforming growth factor beta and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. **Infection and Immunity**; 66: 1233-1236; 1998.

RODRIGUES, V., CORDEIRO-DA-SILVA, A., LAFORGE, M., SILVESTRE, R., ESTAQUIER, J. Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. **Parasites & Vectors**; v. 9, n. 1, p. 118, 2016b.

ROLÃO, N., CORTES, S., GOMES-PEREIRA, S., CAMPINO, L. *Leishmania infantum*: Mixed T-helper-1/T-helper-2 immune response in experimentally infected BALB/c mice. **Exp Parasitol**; 115 (3): 270-6; 2007.

SACKS, D., SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nature Immunology**; 3: 1041-1047; 2002.

SANT'ANA, J.A.P., LIMA, W.G., OLIVEIRA, M.R., SIMÕES, L.A., MICHALICK, M.S.M., MELO, M.N., TAFURI, W.L. & TAFURI, W.G.L., Hepatic granulomas in canine visceral leishmaniasis and clinical status. **Arq Bras Med Vet Zootec**; 59(5): 1137-1144; 2007.

SANTANA, C. C., VASSALLO, J., DE FREITAS, L.A.R., OLIVEIRA, G.G.S., PONTES-DE-CARVALHO, L.C. & DOS-SANTOS, W.L.C. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: A study on naturally infected dogs. **Parasite Immunol**; 30: 515–524; 2008.

SATO, S., BHAUMIK, P., ST-PIERRE, G., PELLETIER, I. Role of Galectin-3 in the Initial Control of *Leishmania* Infection. **Critical Reviews in Immunology**; v. 34, n. 2, p. 147–175, 2014.

SCHWANDER, R., YAMAGUCHI, K., CAO, Z. Requirement of tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 6 in interleukin 17 signal transduction. **J. Exp. Med.**; v.191, p. 1233-1240, 2000.

SCHWARTZ, E., HATZ, C., BLUM, J. New world cutaneous leishmaniasis in travellers. **Lancet Infect Dis**; 6(6):342–9, 2006.

SHAFER, W.M., MARTIN, L.E., SPITZNAGEL, J.K. Cationic antimicrobial proteins isolated from human neutrophil granulocytes in the presence of diisopropyl fluorophosphate. **Infect Immun**; 45: 29–35; 1984.

SILVA-NETO, M. A., WINTER C., TERMIGNONI C. - *Leishmania*: O Desenvolvimento no Inseto vetor e a Transmissão ao Hospedeiro Vertebrado – Tópicos Avançados em Entomologia Molecular: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, **Editora Itabajara da Silva Vaz Junior, CAPÍTULO 14 - A Interação do Protozoário *Leishmania* com seus Insetos Vetores**, 2013.

SINGH, O.P., GIDWANI, K., KUMAR, R., NYLEN, S., JONES, S.L., BOELAERT, M., *et al.* Reassessment of immune correlates in human visceral leishmaniasis as defined by cytokine release in whole blood. **Clin Vaccine Immunol**; 19, pp. 961–966; 2012.

SINGH, O.P., STOBER, C.B., SINGH, A.K., BLACKWELL, J.M., SUNDAR, S. Cytokine responses to novel antigens in an Indian population living in an area endemic for visceral leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**; 6, p. e1874; 2012.

SINGH, S., DEY, A., SIVAKUMAR, R. Applications of molecular methods for Leishmania control. **Expert Rev Mol Diagn**; 5:251–65; 2005.

SINGH, B., SUNDAR, S; Leishmaniasis: vaccine candidates and perspectives. **Vaccine**; 30, 3834, 2012.

SMITH, D. F., RANGARAJAN, D. Cell surface components of *Leishmania*: identification of a novel parasite lectin? **Glycobiology**; v.5, p.161-166, 1995.

SOEHNLEIN, O. Direct and alternative antimicrobial mechanisms of neutrophil-derived granule proteins. **J Mol Med**; 87: 1157–64; 2009.

SOONG, L., HENARD, C. A., MELBY, P. C. Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis. **Semin Immunopathol**; v.34, p.735-751, 2012.

SOUZA, M.A., CARVALHO, F.C., RUAS, L.P., RICCI-AZEVEDO, R., ROQUE-BARREIRA, M.C. The immunomodulatory effect of plant lectins: A review with emphasis on ArtinM properties. **Glycoconj J**; 30: 641–657; 2013. doi: 10.1007/s10719-012-9464-4 PMID: 23299509

SPATH, G. F., GARRAWAY, L. A., TURCO, S. J., BEVERLEY, S. M. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. **Proc Natl Acad Sci USA**; v.100, p.9536-9541, 2003.

SRIVASTAVA, S., SHANKAR, P., MISHRA, J., SINGH, S. Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. **Parasites & Vectors**; v. 9, n. 1, p. 277, 2016.

SRIVASTAVA, S., PANDEY, S. P., JHA, M. K., CHANDEL, H. S., SAHA, B. *Leishmania* expressed lipophosphoglycan interacts with Toll-like receptor (TLR)-2 to decrease TLR-9 expression and reduce anti-leishmanial responses. **Clin Exp Immunol**; v.172, p.403-409, 2013.

STEBUT, E. V. Leishmaniasis. **Journal of the German Society of Dermatology (JDDG)**; 1610-0379, 1303, 2015. DOI: 10.1111/ddg.12595.

STOBER, C. B., LANGE, U.G., ROBERTS, M.T.M., ALCAMI, A., BLACKWELL, J.M. IL-10 from Regulatory T Cells Determines Vaccine Efficacy in Murine

Leishmania major Infection. **The Journal of Immunology**; v. 175, n. 4, p. 2517–2524, 2005.

SUN, H. X., XIE, Y., YE, Y. P. Advances in saponin-based adjuvants. **Vaccine**; v. 27, n. 12, p. 1787–1796, 2009.

SVOBODOVA, M., BATES, P. A., VOLF, P. Detection of lectin activity in *Leishmania* promastigotes and amastigotes. **Acta Trop**; v.68, p.23-35, 1997.

TAPPER, H., KARLSSON, A., MORGELIN, M., FLODGAARD, H., HERWALD, H. Secretion of heparin-binding protein from human neutrophils is determined by its localization in azurophilic granules and secretory vesicles. **Blood**; 99: 1785–93; 2002.

TEIXEIRA, C.R., CAVASSANI, K.A., GOMES, R.B., TEIXEIRA, M.J., ROQUE-BARREIRA, M.C., *et al.* Potential of KM + lectin in immunization against *Leishmania amazonensis* infection. **Vaccine**; 24: 3001–3008; 2006.doi: 10.1016/j.vaccine.2005.11.067 PMID: 16455170

THOMPSON, J. S., BROWN, S. A., KHURDAYAN, V., ZEYNALZADEGAN, A., SULLIVAN, P. G., SCHEFF, S. W. Early effects of tribromoethanol, ketamine/xylazine, pentobarbital, and isoflurane anesthesia on hepatic and lymphoid tissue in ICR mice. **Comp Med**; v.52, p.63-67, 2002.

TOLEDO, K.A., SCWARTZ, C., OLIVEIRA, A.F., CONRADO, M.C.A. V., BERNARDES, E.S., *et al.* Neutrophil activation induced by ArtinM: Release of inflammatory mediators and enhancement of effector functions. **Immunol Lett**; 123: 14–20; 2009. doi: 10.1016/j.imlet.2009.01.009 PMID: 19428547

VAN TIENHOVEN, E. A. E., TEN BRINK, C. T. B., VAN BERGEN, J., KONING, F., VAN EDEN, W., BROEREN, C. P. M. Induction of antigen specific CD4+ T cell responses by invariant chain based DNA vaccines. **Vaccine**, Kidlington, v.19, p.1515-1519, 2001.

VAN, D., V; PLANTINGA, T. S.; DONNELLY, J. P.; KULLBERG, B. J.; BLIJLEVENS, N. M.; NETEA, M. G. Host-microbe interactions in stem cell transplantation: recognizing *Candida* in infection and inflammation. **Virulence**; v.1, p.180-184, 2010.

VIANNA, E. N., HELENA, M., MORAIS, F., SABROZA, P.C., REIS, I.A., DIAS, E.S. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* in urban households as risk factor of transmission of visceral leishmaniasis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**; v. 111, n. 5, p. 302–310, 2016.

VIDAL, I.F., MARTINS, I.V., R.A. LIRA, R.A., TEIXEIRA, M.N., FAUSTINO, M.A.G., ALVES L.C., Serum levels of gamma glutamyl transferase in dogs naturally

infected or not by *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. **Arq Bras Med Vet Zootec**; 61(3): 749-751; 2009.

VITORIANO-SOUZA, J., MOREIRA, N. DAS D., TEIXEIRAS-CARVALHO, A., CARNEIRO, C.M., SIQUEIRA, F.A.M., DE VIEIRA, P.M.A., GIUNCHETTI, R.C., DE MOURA, S.A.L., FUJIWARA, R.T., MELO, M.N., REIS, A.B. Cell recruitment and cytokines in skin mice sensitized with the vaccine adjuvants: Saponin, incomplete freund's adjuvant, and monophosphoryl lipid A. **PLoS One**; v. 7, n. 7, 2012.

VOULDOUKIS, I., RIVEROS-MORENO, V., DUGAS, B., OUAAZ, F., BECHEREL, P., DEBRE, P., MONCADA, S., MOSSALAYI, M.D. The killing of *Leishmania major* by human macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the Fc epsilon RII/CD23 surface antigen. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**; v. 92, n. 17, p. 7804-7808, 1995.

WARBURG, A., SARAIVA, E., LANZARO, G. C., TITUS, R. G., NEVA, F. Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**; v.345, p.223-230, 1994.

WEITZEL, T., MÜHLBERGER, N., JELINEK, T., *et al.* Imported leishmaniasis in Germany 2001-2004: data of the SIMPID surveillance network. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**;24(7):471-6; 2005.

WERNECK, G. L. The control of visceral leishmaniasis in Brazil : end of a cycle? **Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro**; v. 32, n. VI, p. 1-2, 2016.

WERNECK, G. L., RODRIGUES, L., SANTOS, M. V., ARAÚJO, I. B., MOURA, L. S., LIMA, S. S., GOMES, R. B. B.; MAGUIRE, J. H.; COSTA, C. H. N. The burden of *Leishmania infantum chagasi* infection during an urban outbreak of visceral leishmaniasis in Brazil. **Acta tropica**; v. 83, n. 1, p. 13-18, 2002.

WHO. Control of the leishmaniases. World Health Organization technical report series, n. 949, p. 22-26, 2010.

WHO. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. Weekly epidemiological record, n. 47, p. 521-540, 2016.

WHO. Leishmaniasis, 2014. Available at: <http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>. Accessed April 02, 2014.

WHO. Leishmaniasis; Fact Sheet No. 375; WHO: Geneva, Switzerland, 2015. Available online: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/> (accessed on 30 October 2015).

WILSON R, PEARSON C, MCKILLOP JH, BURNETT AK, THOMSON JA. The behaviour of suppressor-inducer T cells following treatment for Graves' disease. **Autoimmunity**; 1990.

WILSON, M.E., JERONIMO, S.M.B., PEARSON, R.D., Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. **Microbial Pathogenesis**; 38:147–160; 2005.

WOYTCHAK, J., KELLER, N., KRIEG, C., IMPELLIZZIERI, D., THOMPSON, R.W., WYNN, T.A., ZINKERNAGEL, A.S., BOYMAN, O. Type 2 Interleukin-4 Receptor Signaling in Neutrophils Antagonizes Their Expansion and Migration during Infection and Inflammation. **Immunity**; v. 45, n. 1, p. 172–184, 2016.

WRIGHT, S.D., SIVERSTEIN, S.C. Receptors for C3b and iC3b promote fagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. **Journal of Experimental Medicine**; 158: 2016-23; 1983.

XYNOS, I.D., TEKTONIDOU, M.G., PIKAZIS, D., *et al.* Leishmaniasis, autoimmune rheumatic disease, and anti-tumor necrosis factor therapy, Europe. **Emerg Infect Dis**;15(6):956–9; 2009.

ZAMBRANO-VILLA, S., ROSALES-BORJAS, D., CARRERO, J.C., ORTIZ-ORTIZ, L. How protozoan parasites evade the immune response. **Trends in Parasitology**; 18: 272-278; 2002.

ZIJLSTRA, E. E., EL-HASSAN, A. M. Leishmaniasis in Sudan: visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, Londres**; v. 95, n. 1, p. 59-76, 2001.